



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM, CAMPUS JURQUILLA

**Expresión del receptor GABA_A oligodendroglial en
células HEK293**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. MARÍA BERENICE VARELA CORREA

TUTORES

DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA
DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. AUREA OROZCO RIVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA UNAM

DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.

QUERÉTARO, JULIO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurofisiología Celular,
perteneciente al Departamento de Neurobiología Celular y
Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad
Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rogelio
Arellano Ostoia y la Dra. Teresa Edith Garay Rojas. Becario
CONACyT no. 778800.**

RESUMEN

El receptor GABA_A (GABA_AR) es el receptor ionotrópico a través del cual el ácido γ -aminobutírico (GABA) ejerce su acción inhibitoria en mamíferos adultos. Se sabe que la señalización GABAérgica mediada por el GABA_AR expresado en oligodendrocitos (OLs) es importante para el proceso de mielinización. Recientemente, nuestro grupo mostró que el receptor GABA_AR expresado en OLs de rata se integra por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$. Para conocer en detalle las propiedades del receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$, las subunidades fueron expresadas de manera heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. Se mostró que algunas características de este receptor son similares a las descritas en el receptor endógeno de rata, pero los valores absolutos no son idénticos; por ejemplo, la sensibilidad a GABA en OLs de rata tiene una EC₅₀ de 80 μ M mientras que en el ovocito de rana es de 50 μ M, esta discrepancia puede atribuirse a causas tales como el microambiente lipídico que prevalece en la membrana del ovocito. Esto llevó a la pregunta de si estas diferencias podrían ser explicadas por el modelo de expresión utilizado. Para expresar el receptor de OLs en un modelo de mamífero que reproduzca el ambiente celular del receptor endógeno de rata, en este trabajo se subclonaron las secuencias codificantes de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$, $\gamma 1$ del GABA_AR de rata y humano, en el vector pCDNA3.1 y se transfectaron en células HEK293. Empleando la técnica de control de voltaje en la modalidad de célula completa, comparamos las características farmacológicas y funcionales de los receptores expresados con las obtenidas en los ovocitos de *Xenopus laevis* y el receptor endógeno oligodendroglial. Los resultados obtenidos muestran la expresión de dos respuestas farmacológicas que sugieren dos conformaciones. Uno pareció estar compuesto por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ ya que fue inhibido por Zinc y potenciado por β -carbolinas como ocurre en el receptor nativo de OLs; el segundo receptor mostró que fue insensible tanto a diazepam como a la butil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCB), sugiriendo que la subunidad $\gamma 1$ no estuvo presente. Además, el receptor GABA_A conformado $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ de rata y humano corroboran la acción de la β -CCB como un modulador alostérico positivo del receptor, ya que su efecto no fue antagonizado por flumazenil (FMZ), un potente antagonista sobre el sitio clásico de las benzodiazepinas (BZDs), lo que

indica que la β -CCB actúa sobre un sitio de unión diferente al descrito. En las células HEK293, tanto el receptor de rata como el humano se comportan como el nativo oligodendroglial. Por ello, las células HEK293 representan un buen modelo de expresión heteróloga para el receptor GABA_A oligodendroglial de rata y humano, pues permite caracterizar con fidelidad el receptor oligodendroglial.

SUMMARY

The GABA_A receptor (GABA_AR) is the ionotropic receptor activated by γ -aminobutyric acid (GABA) that mediates its inhibitory action. GABAergic signaling modulated by GABA_AR expressed in oligodendrocytes (OLs) is important for the myelination process. Recently, our data strongly suggested that the GABA_AR in OLs is composed by $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ subunits. When the properties of the $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ receptor were explored in detail using heterologous expression in *Xenopus laevis* oocytes, most characteristics were similar to those described for the endogenous GABA_A receptor; however, some absolute values were distinct: for example, GABA sensitivity in rat OLs has an EC₅₀ of 80 μ M while in the frog oocyte it is 50 μ M, this discrepancy can be attributed to causes such as the lipid microenvironment in the oocyte membrane. This led to the question of whether these differences could be explained by the expression model used. To explore the properties of the OLs GABA_A receptor in a closer cellular microenvironment, in this study the coding sequences of rat $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ subunits were subcloned into the pcDNA3.1 vector and transfected in HEK293 cells. Then, cells were monitored electrophysiologically using the patch-clamp technique in whole-cell configuration, to compare the pharmacological and functional characteristics of the expressed receptors with those obtained in the *Xenopus laevis* oocytes and with the endogenous receptor.

The results showed the expression of two pharmacological responses that suggest two conformations. One appeared to be composed of $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ subunits as it was inhibited by Zn²⁺ and potentiated by β -carbolines and diazepam, characteristics of the endogenous GABA_AR in OLs; the second receptor was shown to be insensitive to diazepam as well as to butyl- β -carboline-3-carboxylate (β -CCB), suggesting that the $\gamma 1$ subunit was not present. In addition, the rat and human GABA_A receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ corroborate the action of β -CCB as a positive allosteric modulator of the receptor, since its effect was not antagonized by flumazenil (FMZ), a potent antagonist on the classic site of benzodiazepines (BZDs), suggesting that β -CCB acts on a binding site different from that described. In HEK293 cells, both the rat and human receptor behave like the endogenous one, for this reason, HEK293 cells

represent a good heterologous expression model for the rat and human oligodendroglial GABA_A receptor, since they allow the oligodendroglial receptor to be characterized.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Becario No. 778800), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (Cuenta no: 521007520) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto. Este proyecto fue realizado con los fondos de los proyectos PAPIIT 203519 y 205822, otorgados al Dr. Rogelio Arellano Ostoá.

Así mismo, agradezco al Dr. Rogelio Arellano y a la Dra. Edith Garay, mis tutores, por la dirección de esta investigación. Mis mentores que, con su guía, apoyo y consejos, hicieron posible este proyecto. Pero, sobre todo gracias por ser generosos, atentos y siempre hacerme sentir en casa.

Además, agradezco a la Dra. Aurea Orozco Rivas y a la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, miembros del Comité tutorial, por su tiempo, críticas, consejos y guía durante el desarrollo del proyecto. Pero principalmente, por ser tan generosas, respetuosas y amables en todo momento. Conocer a mujeres científicas comprometidas y apasionadas como ustedes, es una inspiración para mí.

A los miembros del jurado de examen de grado: el Dr. Lenin David Ochoa de la Paz, la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano, por sus comentarios y observaciones a este escrito.

También, aprovecho para agradecer a mis compañeros del laboratorio D-14 de Neurofisiología celular, al Dr. Abraham Cisneros Mejorado, Pablo Ordaz, Gaby Cárdenas, Fidel Vélez, Andrés Vázquez, Antonia Colom, Ana Luisa Ocampo, por su apoyo, enseñanza y compañía durante esta experiencia. Así mismo, a Jesús David, Denisse Vega y a mis compañeros de generación de la maestría en Neurobiología por el acompañamiento y los buenos momentos.

Agradezco, además, a la unidad de enseñanza y estudios de posgrado, a la Dra. Nuri Aranda, a las unidades del Instituto de neurobiología por el apoyo, en especial a la unidad de proteogenómica y a la coordinadora de la maestría la Dra. Maricela Luna.

Por último, me gustaría agradecer al Instituto de Neurobiología (INB), a sus investigadores y trabajadores en general, por aportar a mi crecimiento y aprendizaje. A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por aceptarme y brindar las herramientas para mi formación profesional.

DEDICATORIA

A mis padres, Carmen y Ramón....

Por su apoyo, su ejemplo de trabajo duro y amor

A mi hermana Miriam...

Por ser mi compañera de aventuras, por impulsarme y por estar presente aún a la distancia. Espero ser inspiración

A mi familia, tías y primos

Quienes me han acompañado y motivado, que sepan que los sueños se cumplen

A mis amigos, Jesús y Denisse....

Por acompañarme y ayudarme en el camino de la ciencia

A mis amigas Karen y Karla...

Por sus consejos y ser incondicionales

A David....

Por apoyarme en mis proyectos, cerca o lejos de casa, hacerme sentir siempre acompañada. Por brindarme comprensión, paciencia y amor

En especial, este logro es para mí.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| II. ANTECEDENTES..... | 12 |
| A. OLIGODENDROCITOS..... | 12 |
| B. IMPORTANCIA DE LOS OLIGODENDROCITOS..... | 13 |
| C. COMUNICACIÓN NEURONA-OLIGODENDROCITO Y NEUROTRANSMISORES | 14 |
| D. GABA Y OLIGODENDROCITOS | 15 |
| E. RECEPTORES GABA _A | 16 |
| F. GABA _A en OLs | 17 |
| G. MODELOS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA..... | 19 |
| H. CONSIDERACIONES SOBRE LOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA | 20 |
| 1. LÍPIDOS DE MEMBRANA | 20 |
| 2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES | 21 |
| I. CÉLULAS HEK293..... | 22 |
| III. HIPÓTESIS | 24 |
| IV. OBJETIVOS | 25 |
| A. GENERAL | 25 |
| B. ESPECÍFICOS | 25 |
| V. METODOLOGÍA..... | 26 |
| A. RESTRICCIÓN DE PLÁSMIDOS..... | 26 |
| B. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GEL DE AGAROSA. | 26 |
| C. LIGACIÓN | 26 |
| D. TRANSFORMACIÓN | 27 |
| E. MINIPREP | 27 |
| F. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR..... | 27 |
| G. CÉLULAS HEK293..... | 28 |
| H. TRANSFECCIÓN | 28 |
| I. TÉCNICA DE CONTROL DE VOLTAJE (PATCH-CLAMP) | 29 |
| VI. RESULTADOS | 31 |

| | | |
|-------|---|----|
| A. | CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES PORTADORES DE SECUENCIAS CODIFICANTES PARA LAS SUBUNIDADES $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ DE RATA Y HUMANO | 31 |
| B. | TRANSFECCIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE GABA _A EN CÉLULAS HEK293..... | 33 |
| C. | CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR GABA _A DE RATA Y HUMANO EXPRESADO EN CÉLULAS HEK293. | 34 |
| 1. | CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR GABA _A DE RATA | 34 |
| 2. | CARACTERÍSTICAS DEL RECEPTOR GABA _A HUMANO | 40 |
| 3. | RESPUESTA A LA CO-APLICACIÓN DE β -CCB + FLUMAZENIL EN EL RECEPTOR GABA _A DE RATA Y HUMANO..... | 42 |
| VII. | DISCUSIÓN..... | 44 |
| A. | CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES EXPRESADO..... | 45 |
| B. | EFFECTO EN PRESENCIA DE ZINC | 46 |
| C. | MODULADORES | 46 |
| VIII. | CONCLUSIONES..... | 50 |
| IX. | LITERATURA CITADA..... | 51 |
| X. | Índice de figuras | 63 |
| XI. | Índice de tablas | 63 |
| XII. | Lista de abreviaturas | 64 |

I. INTRODUCCIÓN

El receptor GABA_A es el receptor ionotrópico a través del cual el GABA ejerce su acción inhibitoria. Se conocen 19 subunidades que pueden conformar la estructura pentamérica de dichos receptores (Sieghart & Savić, 2018; Sinha *et al.*, 2021). Evidenciando una heterogeneidad molecular en cada tipo celular que los expresa (Sequeira *et al.*, 2019). Con el fin de caracterizar el GABA_AR expresado en oligodendrocitos (OLs), en nuestro laboratorio, a partir del cDNA obtenido de OLs en cultivo, las secuencias codificantes de las subunidades del receptor GABA_A fueron clonadas y expresadas heterológamente en varias combinaciones en ovocitos de *Xenopus laevis*, un sistema de expresión eficiente y ampliamente utilizado, y las respuestas a GABA de los receptores expresados fueron estudiadas electrofisiológicamente (Ordaz *et al.*, 2020). De las combinaciones probadas, el receptor conformado por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ mostró un perfil farmacológico muy similar al del receptor endógeno de los OLs (Arellano *et al.*, 2016). La sensibilidad observada al GABA, la del Zn²⁺, así como a los moduladores alostéricos diazepam, indiplon y a la β -CCB en esta conformación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$, fueron similares a las descritas en el receptor nativo oligodendroglial de rata, aunque los valores absolutos de sensibilidad farmacológica no fueron idénticos. También, resultó evidente que algunas acciones farmacológicas no se reproducían; por ejemplo, al bloquear el sitio clásico de benzodiazepinas utilizando FMZ, el efecto de β -CCB fue diferente en los receptores expresados en el ovocito. Las diferencias observadas pueden deberse a varias causas, entre ellas, por ejemplo, al microambiente lipídico que prevalece en la membrana del ovocito, o a la expresión de proteínas ancilares capaces de modificar las características del receptor a nivel postraduccionales. Otro sistema de expresión heteróloga empleado para caracterizar receptores del tipo GABA_A, son las células HEK293 (Human Embryonic Kidney). Aún cuando ambos, los ovocitos de *X. laevis* y las células HEK293 son sistemas de expresión heteróloga eficientes, no siempre se obtienen los mismos resultados durante la caracterización funcional de receptores empleando uno u otro sistema.

Con la finalidad de caracterizar el receptor oligodendroglial en un microambiente propio de las células de mamífero, en este trabajo se expresaron las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$, $\gamma 1$ del GABA_AR en células HEK293 y sus características farmacológicas y funcionales se compararon con las ya obtenidas en los ovocitos de *X. laevis* y el receptor endógeno.

II. ANTECEDENTES

A. OLIGODENDROCITOS

El sistema nervioso central (SNC) es una estructura compleja donde la interacción entre las diferentes estirpes celulares es fundamental en la fisiología del sistema. Dentro de esta diversidad celular se encuentran las células gliales, responsables de la homeostasis del SNC. Para lograrlo, establecen el contacto y la comunicación intercelular, así como el soporte trófico a las neuronas y su microambiente celular, además de proteger contra agentes patógenos (Bradl & Lassmann, 2010; Allen & Lyons, 2018). Los OLs son las células gliales que intervienen en el proceso de mielinización del SNC. Su descubrimiento y caracterización original fue el resultado de los estudios por medio de técnicas microscópicas por Pio del Río Hortega hace un siglo, y a partir de su descubrimiento fueron objeto de interés, y al igual que otros tipos de glía, el avance en el entendimiento de sus funciones e importancia en la etiología de diversas enfermedades se vio enlentecida por el mayor interés que produce la obvia importancia de las células neuronales en las funciones cerebrales (Wilkins *et al.*, 2003; Pérez-Cerdá *et al.*, 2015). Hoy en día comienza a ser entendido el papel central que estas células tienen en el SN.

Es durante el desarrollo del SNC que las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) se generan a partir de las primeras células multipotentes en la superficie ventricular del tubo neural (Warf *et al.*, 1991; Hayashi & Suzuki, 2019; Kuhn *et al.*, 2021). Posteriormente, se orquestan movimientos migratorios que les permiten alcanzar su destino final. Es entonces que estas células completan su diferenciación. Los OLs maduros tienen la capacidad de extender procesos cuyos extremos envuelven a los axones con una membrana lipoproteica llamada vaina de mielina (Baumman & Pham-Dinh, 2001; McTigue & Tripathi, 2008; Fields, 2014). El número de procesos que forman las vainas de mielina a partir de un solo

oligodendrocito varía de acuerdo al área del SNC e incluso de la especie de vertebrado.

Del Río Hortega en 1921, describió cuatro fenotipos de OLs basados en el número de procesos, su morfología y el grosor de la vaina de mielina. Los oligodendrocitos con fenotipos I y II presentan un cuerpo celular pequeño y redondeado, con entre 4 y 5 procesos que pueden mielinizar entre 10 y 30 axones de $< 2 \mu\text{m}$ (pequeño calibre) y conforman la mayor parte de la sustancia blanca. La característica que permite diferenciar entre ambos fenotipos es la orientación de los axones que mielinizan. Los de tipo I interactúan con axones con orientación indistinta y una distribución aleatoria, mientras que los de tipo II se asocian con axones que se orientan de forma paralela. Los OLs tipo III, tienen un soma ovoide y alargado, con un diámetro entre 12 y $15\mu\text{m}$ que mielinizan axones con un calibre de entre 4 y $15 \mu\text{m}$. Por último, los OLs de tipo IV se asocian a axones con un calibre $> 10 \mu\text{m}$, y mielinizan un único axón (Butt, 2013; Velumian & Samoiloa, 2014).

Los criterios morfológicos ayudan a diferenciar diferentes tipos de OLs, aunque frecuentemente resultan insuficientes en la caracterización fenotípica de los estadios de diferenciación. En ese sentido, se han identificado marcadores moleculares que son expresados diferencialmente en cada etapa del desarrollo y maduración de estas células.

B. IMPORTANCIA DE LOS OLIGODENDROCITOS

El proceso de mielinización llevado a cabo por los OLs es un factor determinante en la fisiología del SNC, considerado el factor determinante del éxito evolutivo de los vertebrados.

La vaina de mielina que rodea los axones de las neuronas se conforma como una estructura en espiral, producto del enrollamiento de las prolongaciones de la membrana plasmática de los OLs sobre los axones; funciona como aislante por su composición lipídica, su disposición modifica las propiedades de cable del axón aumentando la velocidad de propagación de las señales eléctricas, lo cual acelera

notablemente la comunicación entre regiones distales en el SN (Young *et al.*, 2013) e incrementa el ancho de banda de la transmisión.

La mielina es el constituyente primario de regiones de la sustancia blanca del SNC, sin embargo, no es exclusiva de estas regiones, la sustancia gris contiene una importante proporción de mielina. Su peso seco contiene 70% de lípidos y 30% de proteínas. Los principales componentes lipídicos de la mielina son colesterol, fosfolípidos y glicolípidos en proporciones 4:3:2. Por otro lado, los principales componentes proteicos de la mielina son la proteína proteolipídica (PLP), la proteína básica de la mielina (MBP) y la 2', 3'-nucleótido cíclico-3'-fosfohidrolasa (CNPasa). (Schmit *et al.*, 2015; Tomassy *et al.*, 2016; Campagnoni & Macklin, 2022). Estos componentes principales en su conjunto, proporcionan las propiedades específicas a la mielina.

C. COMUNICACIÓN NEURONA-OLIGODENDROCITO Y NEUROTRANSMISORES

Dado el contacto estrecho entre las neuronas y los OLs, la comunicación bidireccional entre ambos toma relevancia en el desarrollo del SN. Diversos autores han mostrado el control de las neuronas en diversas etapas del desarrollo de OLs, con dos propósitos principales, el primero es controlar el momento preciso de diferenciación de OPC en el instante y lugar apropiado, y el segundo se centra en proveer de OL suficientes para cubrir la superficie axonal que requiere mielinización (Barres & Raff, 1999; Boiko & Winckler, 2006; Van Tilborg, *et al.*, 2018). Entonces, el proceso está coordinado por las propiedades estructurales, moleculares y electrofisiológicas de las neuronas, lo cual implica que el proceso es dependiente de la comunicación intercelular neurona-OL (Barres & Raff, 1993; Barres & Raff, 1999; Simons & Trajkovic, 2006; Young *et al.*, 2013). Se ha evidenciado la importancia de las moléculas de señalización derivadas de ambos tipos celulares en estos procesos, y entre ellas, los receptores de neurotransmisores juegan un papel importante. Los receptores a glutamato, se sugiere participan en el desarrollo de OLs a través de sus receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA); la activación de corrientes a través de éste

en los OPCs aumenta su tasa de migración y la inhibición disminuye este parámetro en un 90%. La inhibición de receptores al ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) también disminuye un 40% la migración de OPCs (Wang *et al.*, 1996; Gudz *et al.*, 2006; Káradóttir & Attwell, 2007). El glutamato parece regular el desarrollo temprano de los OLs, mientras la adenosina y el ATP son moduladores del desarrollo tardío y la mielinización. La adenosina activa sus receptores en los OPCs aumentando el Ca^{2+} intracelular, lo que provoca la disminución de la proliferación y favorece la migración, diferenciación y también la mielinización (Stevens *et al.*, 2002; Othman *et al.*, 2003). Además, se ha estudiado el papel de los receptores a GABA en el linaje oligodendroglial, favoreciendo la diferenciación, mielinización y remielinización (Vélez-Fort *et al.*, 2012; Arellano *et al.*, 2016; Hamilton *et al.*, 2017; Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020).

D. GABA Y OLIGODENDROCITOS

Los OLs y las células del linaje oligodendroglial presentan sensibilidad a varios neurotransmisores; por ejemplo, las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs, así como los OLs maduros responden a GABA. Esta respuesta es traducida a través de receptores a GABA expresados en su membrana y pueden ser de dos tipos: GABA_{A} y GABA_{B} . Los GABA_{B} son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G que en la presinápsis neuronal inhiben la liberación de neurotransmisores actuando sobre canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje. En la postsinápsis, los GABA_{B} inhiben a la adenilato ciclasa (AC), provocando la activación de los canales de potasio tipo Kir3, hiperpolarizando la membrana postsináptica (Bettler *et al.*, 2004). En el linaje oligodendroglial la activación de GABA_{B} ha sido relacionada con la migración y proliferación de los OPCs (Luyt *et al.*, 2007; Serrano-Regal *et al.*, 2020a; Pudasaini *et al.*, 2022).

Así mismo, GABA evoca una corriente mediada por el receptor-canal GABA_{A} en los OLs (Gilbert *et al.*, 1984; Serrano-Regal *et al.*, 2020a). Al activarse el receptor, debido a una elevada concentración de Cl^- intracelular, tanto las células maduras como las OPCs se despolarizan (Arellano *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2021), esta acción

opera canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje lo cual produce un aumento en la concentración de calcio intracelular. Los niveles elevados de Cl^- intracelular se deben a la expresión de transportadores NKCC1 que transportan Cl^- al interior de la célula (Wang *et al.*, 2003; Marinelli *et al.*, 2016). Se sabe que GABA influye en la proliferación de las células del linaje oligodendroglial, aumenta la mielinización y la disminución de la longitud de los internodos (Hamilton *et al.*, 2017). Por lo tanto, la liberación endógena de GABA es importante para determinar el desarrollo de estas células (Zonouzi *et al.*, 2015). Estas funciones podrían explicar las observaciones en las que la señalización GABAérgica afecta los procesos de mielinización y remielinización (Baulieu & Schumacher, 1997; Zonouzi *et al.*, 2015; Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020).

E. RECEPTORES GABA_A

Los receptores GABA_A son canales iónicos pentaméricos, formados por las combinaciones entre las subunidades α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , ρ_{1-3} , δ , ϵ y θ . Las diferentes subunidades son expresadas de manera diferencial en el cerebro, pero se sabe que los subtipos de receptores más abundantes expresan subunidades α , β y γ (McKernan & Whiting, 1996; Olsen & Sieghart, 2008). Cada una de las subunidades del receptor GABA_A contienen un dominio N-terminal extracelular de aproximadamente 200 aminoácidos donde se ubican dos cisteínas que forman un puente disulfuro creando el llamado "bucle Cys". Además, contienen cuatro dominios transmembranales (TM1 a TM4) de aproximadamente 20 aminoácidos y un bucle intracelular entre las subunidades vecinas en el pentámero.

En los GABA_AR se han identificado dos sitios de unión a GABA ubicados entre las subunidades α y β , y también se han demostrado los determinantes estructurales para compuestos moduladores, por ejemplo, las benzodiazepinas (BZDs), moduladores alostéricos positivos se unen preferencialmente a un sitio ubicado entre las subunidades $\alpha+\gamma$ - (Böhme *et al.*, 2004; Richter *et al.*, 2012; Sieghart *et al.*, 2018) (Fig 1). La modulación por agentes como las BZDs, los barbitúricos, los anestésicos,

el etanol y los esteroides neuroactivos, ha convertido a estos receptores en un blanco de estudio farmacológico con importancia clínica claramente relevante.

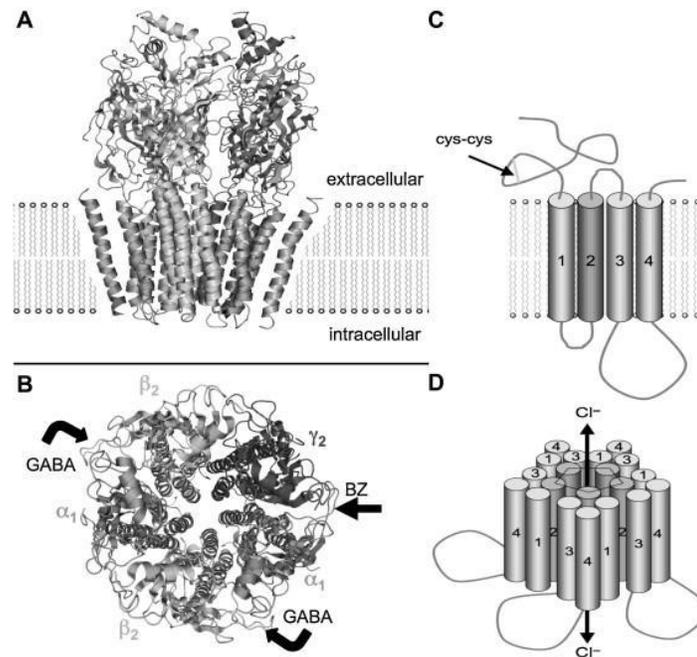


Figura 1. Modelo del Receptor GABA_A. Modelo del pentámero en vista lateral **(A)** y vista superior **(B)** basado en la alta homología de secuencia con el receptor nicotínico de acetilcolina. Hay dos sitios de unión para GABA, entre las subunidades α y β (en B, flechas dobladas) y uno para las BZDs entre las subunidades alfa y gamma (en B, flecha recta). **(C)** Una vista esquemática muestra la topología de cada subunidad con un gran bucle extracelular que contiene el puente disulfuro entre cisteínas y 4 dominios transmembrana (M1-M4), el segundo de los cuales forma el canal de iones cloruro. La unión de GABA permite que el canal se abra y conduzca iones Cl⁻, lo que resulta en el potencial postsináptico inhibitorio rápido (IPSP). **(D)** Disposición putativa de 5 subunidades para formar un pentámero con un canal central de cloruro revestido por la región transmembranal M2 (Greenfield, 2013).

F. GABA_A en OLs

Como se mencionó, los receptores GABA_A pueden estar conformados por diferentes subunidades, lo que potencialmente daría origen a una variedad de receptores con propiedades específicas. Los receptores GABA_A expresados en OLs muestran características únicas que los distinguen de los receptores presentes en neuronas y astrocitos. Arellano y colaboradores (2016), encontraron que en co-

cultivos primarios de nervio óptico de rata de neuronas y OLs, el contacto con los axones mantiene la expresión de receptores funcionales GABA_A, que se pierde en los OLs sin contacto con los axones. Es decir, la sensibilidad a GABA está regulada por la estrecha relación entre los OLs y el axón. La caracterización farmacológica de estos receptores dirigió la determinación de la identidad de las subunidades que participan en la conformación del principal receptor GABA_A expresado en OLs. Debido a que el receptor GABA_A endógeno de OLs tiene una afinidad relativamente baja por su agonista GABA y es sensible a Zn²⁺ en el rango μM, a la vez que es sensible a moléculas que actúan sobre el sitio clásico de BZDs, se propuso que el receptor está conformado por las subunidades α3, β2 o β3 y γ1 o γ3 (Arellano *et al.*, 2016). Ordaz y colaboradores (2021) clonaron las subunidades α3, β2, β3, γ1 y γ3 a partir del cDNA de OLs de rata y las expresaron heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis* en diferentes configuraciones, mostrando que la combinación α3β2γ1 conforma un receptor funcional que cumple con la mayoría de las características del GABA_AR oligodendroglial. Sin embargo, la sensibilidad del receptor expresado en ovocitos a varias drogas no es igual a la del receptor endógeno de rata en OLs. Por ejemplo, la EC₅₀ para GABA es de 53 ± 4μM en el caso del receptor expresado en los ovocitos, mientras que en el receptor endógeno de OLs es un poco mayor de 70 a 100 μM. En el caso de la sensibilidad a Zn²⁺, la IC₅₀ del receptor expresado en ovocitos es de 25 ± 2.68μM, mientras que la del endógeno de OLs es de 8.35 ± 1.9μM. Otra diferencia importante es el efecto de la β-carbolina (β-CCB), un modulador alostérico positivo. Esta droga actúa como un potenciador de la respuesta al agonista, en ambos receptores, tanto en el receptor endógeno como en el expresado de manera heteróloga en los ovocitos; sin embargo, al co-aplicarse con flumazenil (FMZ), un antagonista del sitio de unión de las β-carbolinas (mismo sitio que el demostrado para BZDs), la potenciación por β-CCB se incrementa significativamente en los ovocitos, mientras que en el receptor endógeno la presencia de FMZ no provoca diferencia.

Estas diferencias importantes en las características del receptor en ambas condiciones, pueden explicarse, entre otros factores, por la composición diferente de la membrana y del ambiente intracelular del ovocito comparada con la de los OLs.

G. MODELOS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA

La expresión heteróloga utilizando tanto sistemas eucariotes como procariotes, es una técnica ampliamente utilizada para la expresión de proteínas que permite estudiar su estructura y función a nivel molecular (Gomes *et al.*, 2016). Hoy en día hay una gran diversidad de líneas celulares que pueden emplearse con este fin, el uso de un sistema de expresión u otro puede influir sobre las características de la proteína que se pretende expresar. Por ejemplo, la expresión de receptores GABA_A conformados por homómeros de las subunidades σ , presentan una menor sensibilidad a GABA con una cinética de desactivación más rápida cuando son expresados en células HEK293 que cuando son expresados en ovocitos de *X. laevis* (Yang *et al.*, 2006). Semejante a lo que se observa en los GABA_AR, también se han reportado diferencias en el comportamiento de receptores a odorantes cuando son expresados usando estos dos sistemas (Hou *et al.*, 2020).

Aun cuando no existe una explicación clara acerca de las características funcionales distintas de una proteína que se observan cuando se expresan en dos sistemas diferentes, se piensa que factores como componentes membranales tales como una diferente composición lipídica, la expresión de distintos mecanismos intracelulares y/o la acción de moléculas chaperonas, y la participación de microambientes diferenciales, podrían afectar la actividad y características de una determinada proteína de membrana. Por ello, se sugiere emplear un sistema heterólogo que asemeje las características de la proteína de interés.

H. CONSIDERACIONES SOBRE LOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA

1. LÍPIDOS DE MEMBRANA

Los lípidos de la membrana participan en la fluidez y diversas funciones biológicas clave, como la organización espacial de las células, la adhesión celular, adhesión de toxinas y patógenos, transducción de señales o tráfico de proteínas (Zhang *et al.*, 2017; Bieberich, 2018). Así, el grosor de la bicapa, su rigidez y la flexión y curvatura espontánea de la monocapa pueden afectar la función de las proteínas embebidas en ella (Phillips *et al.*, 2009) (Figura 2).

Las proteínas de membrana, y en especial los receptores de membrana, requieren de un entorno lipídico específico, ya sea como cofactores para sus funciones o como “co-estructuras”. Por ejemplo, el colesterol funciona como cofactor sobre la función de algunos receptores de membrana (Opekarova & Tanner, 2003; Paila *et al.*, 2009; Poitelon *et al.*, 2020) como el de la rodopsina, el receptor de serotonina 5-HT, el receptor adrenérgico β_2 , receptor de oxitocina, entre otros (Klein *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 1996; Pucadyil & Chattopadhyay, 2004; Hanson *et al.*, 2008). Se sabe de tres mecanismos por los que el colesterol afecta la función de unión del ligando: cambiando la fluidez de la membrana o por interacciones específicas del colesterol con el receptor, favoreciendo la estabilidad del receptor hasta que alcanza su localización funcional o interactuando con el receptor induciendo un estado de alta afinidad (Boesze-Battaglia & Schimmel, 1997; Henin *et al.*, 2014).

Algunas proteínas recombinantes expresadas en sistemas de expresión heteróloga, como se describió para algunas de las proteínas endógenas de membrana, pueden adquirir una integridad estructural y funcional basada en las interacciones con lípidos circundantes que las estabilizan actuando como cofactores indispensables (van Meer *et al.*, 2008). La expresión de proteínas recombinantes de membrana, por lo tanto, requiere un entorno lipídico favorable dentro de las células huésped (Fantini & Barrantes, 2009).

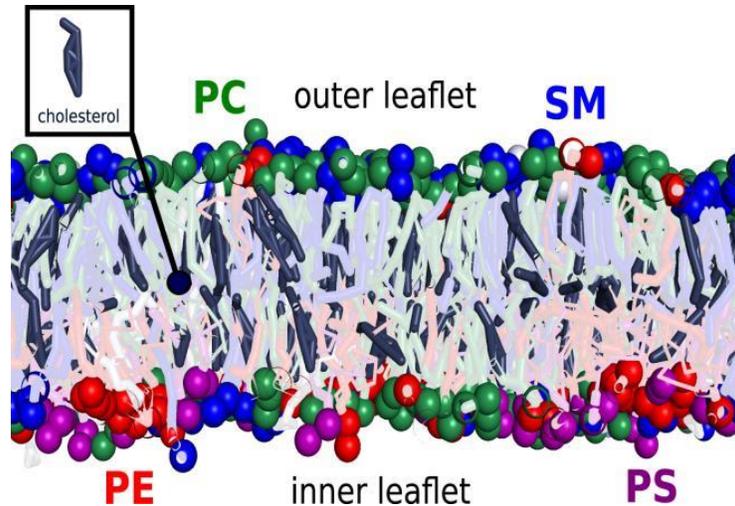


Figura 2. Simulación molecular de la membrana plasmática. La monocapa externa de la membrana plasmática está enriquecida en fosfolípidos, como fosfatidilcolina (**PC**) y esfingomiélin (**SM**), mientras que la monocapa interna está enriquecida en fosfatidiletanolamina (**PE**) y fosfatidilserina (**PS**). El colesterol es una molécula que puede “moverse” libremente entre las monocapas (Risselada, 2019).

2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

La vía secretora en eucariotes es un sistema complejo que propicia el plegado, ensamblaje, la modificación postraduccional y el transporte de polipéptidos recién traducidos. Asociado a cada paso se necesitan chaperonas y otras enzimas para ayudar al plegamiento y limitar la agregación de los polipéptidos (Ailor & Betenbaugh, 1999; Harrison & Jarvis 2007; Dalton & Barton, 2014). La mayoría de las proteínas son moléculas complejas que necesitan ser modificadas postraduccionalmente para obtener su bioactividad completa. La sofisticación entre sistemas de expresión en los diferentes organismos puede cambiar, pues es un mecanismo propio de cada condición celular (Demain & Vaishnav, 2009). Por otro lado, se han observado chaperonas específicas de función y tipo celular (Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

Muchos de esos factores se deben tomar en cuenta para elegir el sistema de expresión adecuado y más cercano a la expresión de la proteína que se desea estudiar. Son también estos factores los que podrían generar diferencias en los resultados entre sistemas de expresión.

I. CÉLULAS HEK293

Las líneas celulares de mamíferos son la plataforma preferida para la expresión de proteínas, ya que pueden producir proteínas grandes y complejas, con modificaciones postraduccionales y pueden secretarse en lugar de requerir lisis celular para extraerlas (Dumont *et al.*, 2016). Hablando específicamente de las líneas celulares humanas, una de las mayores ventajas es la alta probabilidad de que la proteína resultante tenga las modificaciones postraduccionales consistentes con las observadas en proteínas humanas endógenas (Swiech *et al.*, 2012).

La línea celular HEK293, proviene de células embrionarias de riñón humano que fueron transformadas con el ADN del adenovirus tipo 5, el cual fue incorporado en el cromosoma 19 del genoma del hospedero (Graham *et al.* 1977; Huang *et al.*, 2005; Ooi *et al.*, 2016). Actualmente, las células HEK293 son una de las líneas celulares más utilizadas y una herramienta viable para la producción de bioterapéuticos, debido a su alta tasa de crecimiento, su alta densidad celular, su metabolismo eficiente, flexible manipulación genética y su eficiencia en la producción de proteínas (Thomas & Smart, 2005; Nettleship *et al.*, 2015; Arena *et al.*, 2018; Pulix *et al.*, 2021).

Las células HEK293 son un modelo muy eficiente en la expresión de canales iónicos y receptores transmembrana, pues poseen una baja expresión de canales nativos (Davies *et al.*, 2000; Thomas & Smart, 2005) y cuentan con la maquinaria para realizar todas las modificaciones postraduccionales detectadas en las células humanas (Hu *et al.*, 2018), lo que permitiría caracterizar electrofisiológicamente las proteínas. Los componentes de membrana de las células HEK293, son de interés al ser un modelo de expresión heteróloga que podríamos utilizar para la expresión heteróloga de GABA_ARs. Como se mencionó, no poseen un gran número de proteínas de membrana, sin embargo, herramientas como la transcriptómica y proteogenómica, han ayudado a completar esta información evidenciando la presencia del ARNm correspondientes a receptores o canales, y en algunos casos

la proteína. En la Tabla 1. podemos encontrar algunos de los receptores y canales expresados (ARNm o proteína) en las células HEK293.

Tabla 1. Receptores o subunidades de proteínas (detectadas como proteína o ARNm) endógenas a la célula HEK293 (Thomas & Smart, 2005).

| Receptores ionotrópicos | Receptores metabotrópicos | Dependiente de voltaje y otros |
|--|---|--|
| Acetilcolina muscular (AChR) δ | AChR muscarínico | Canales de potasio: dependientes de voltaje |
| Acetilcolina nicotínica (nAChR): $\alpha 7$ y $\alpha 5$ | Metabotrópico (m) GluR: 1β y 4 | Canal de sodio: BNaC2 y $\beta 1A$ |
| Glutamato (GluR) 3 | GABA _B R1A | Canal de calcio dependiente de voltaje: $\alpha 2_{\beta}$, $\alpha 2_{\delta}$ |
| Ácido γ -aminobutírico (GABA _A R): $\beta 3$, $\gamma 3$ y ϵ | 5-hidroxitriptamina: (5-HT) 1_D , 6 y 7_B | Proteína tirosina quinasa (EPHB2) |
| Glicina (GlyR) β | Dopamina D2 | PKA: subunidades catalíticas y reguladoras (R) II |

El estudio en detalle de la estructura-función del GABA_AR expresado en OLS requiere de contar con un sistema de expresión heteróloga que reproduzca con mejor exactitud las características del receptor endógeno de rata, por lo que proponemos expresarlo en un sistema cercano evolutivamente al origen de las células donde se inició su caracterización, como son las células HEK293. Además, al ser una línea celular de humano presenta las condiciones idóneas para expresar el receptor GABA_A oligodendroglial de la misma especie, como un primer esfuerzo por caracterizar las propiedades de este importante receptor para la fisiología del SNC.

III. HIPÓTESIS

La expresión heteróloga en células HEK293 de los receptores GABA_A conformados por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ de rata y humano, mostrarán características funcionales y farmacológicas similares a las observadas en el receptor nativo oligodendroglial de roedores.

IV. OBJETIVOS

A. GENERAL

Caracterizar funcional y farmacológicamente al receptor GABA_A conformado por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ de rata y humano expresados heterológicamente en células HEK293.

B. ESPECÍFICOS

- Clonar las secuencias codificantes de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$, $\gamma 1$ de rata y humano en el vector de expresión pcDNA3.1.
- Transfectar células HEK293 con los plásmidos construidos.
- Caracterizar las propiedades farmacológicas y funcionales de los receptores expresados en células HEK293 por la técnica de control de voltaje en célula completa.

V. METODOLOGÍA

A. RESTRICCIÓN DE PLÁSMIDOS

Se obtuvieron los fragmentos codificantes de las diferentes subunidades a través de ensayos de PCR, usando como molde plásmidos pXENEX donde previamente se habían clonado las secuencias e iniciadores conteniendo secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción, BamHI o Not. Se emplearon enzimas de restricción para cortar las cadenas de DNA de los plásmidos recombinantes (Anand *et al.*, 2004). Para la restricción se usaron de 1 a 3 μg de los plásmidos de interés y 3 U por μg de DNA de las diferentes enzimas de restricción. Las digestiones se hicieron en un volumen total de 30 μl empleando el amortiguador correspondiente para cada enzima (1X). En caso de dobles digestiones se seleccionó el amortiguador más compatible para ambas enzimas. Las muestras se incubaron de 1-16 horas a 37°C.

B. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GEL DE AGAROSA.

El DNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TBE 0.5X (89 mM Tris-borato y 2 mM EDTA, pH 8.3) Las bandas de los fragmentos de interés fueron identificadas en el gel y el segmento de interés fue cortado con una navaja de bisturí. Para extraer el DNA se utilizó el kit de recuperación de DNA, zymoclean (No. cat. D4001 cia EE. UU) siguiendo las instrucciones del proveedor. El DNA se eluyó en un volumen de 6 a 15 μl según la cantidad de DNA en el gel.

C. LIGACIÓN

Para la ligación se usaron 75 ng de los plásmidos y de 150 a 300 ng del DNA purificado del gel. La reacción se realizó en un volumen total de 20 μl , donde 10 μl

fueron del amortiguador 2X, 1 μ l (200U) de la enzima T4 ligasa, y el resto de agua. La reacción de ligación se incubó a 25 °C por 30 min.

D. TRANSFORMACIÓN

7 μ l de la reacción de ligación se añadieron a 200 μ l de células competentes XL-Blue (Unidad de Proteogenómica, INB) y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente a las bacterias se les dio un choque térmico a 42 °C durante 1 min. Las células se volvieron a colocar en hielo por 1 min y se les adicionaron 400 μ l de medio LB y se incubaron por 30 min a 37 °C. A continuación, se tomaron 200 μ l de bacterias y se sembraron en placas de LB agar con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C.

E. MINIPREP

A partir de un cultivo de 4 ml de toda la noche de las bacterias de interés, se tomaron 3 ml para obtener el plásmido. Se centrifugaron los 3 ml de bacterias y la pastilla se resuspendió en el medio excedente después de invertir el tubo para eliminar el medio.

Posteriormente, se agregaron 300 μ l de la solución TENS (Tris 10mM, EDTA 1mM, NaOH 0.2 N y 1% SDS) y se mezcló por inversión para romper las células. Después se agregaron 150 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se mezcló por inversión y se centrifugó 10 min a 14000 rpm para empastillar el DNA genómico, las proteínas y los lípidos. Se tomó el sobrenadante y se precipitó con 900 μ l de etanol absoluto y se centrifugó 2 min a 14 000 rpm. La pastilla se lavó con etanol al 70 % y el plásmido se resuspendió en 40-50 μ l.

F. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

Las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 μ l donde 4 μ l fueron de buffer 5X, 2 μ l de la mezcla de oligonucleótidos (5 μ M de cada uno), 0.4 μ l de dNTP (10 μ M) 0.2 μ l de la enzima Phusion DNA polimerasa y 100 ng del plásmido de interés.

G. CÉLULAS HEK293

La línea celular utilizada fue HEK293 (Graham, 1997) (No. cat. CRL1573, ATCC, Virginia, USA). Las células fueron cultivadas en medio DMEM (medio basal medium Eagle) suplementado con 10 % de suero bovino fetal y penicilina/estreptomicina (0.5%). Se mantuvieron a 37 °C y atmósfera de 5 % de CO₂. Las células se cultivaron como monocapa en un frasco de cultivo y se tripsinizaron de forma rutinaria dos veces por semana.

H. TRANSFECCIÓN

Se realizó la transfección transitoria de las células HEK293 con una mezcla de los plásmidos conteniendo las secuencias de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ del receptor GABA_A o de la proteína EGFP 48 horas antes del registro.

Para ello, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio previamente tratados con poli-D-Lisina, para esto, los cubreobjetos se colocaron de manera individual en placas de 24 pozos y se adicionó 0.5 ml de poli-D-lisina (1x). La solución de poli-D-lisina se retiró después de 30 min y los cubreobjetos se lavaron tres veces con agua MQ estéril y se dejaron secar.

Las células HEK293 fueron tripsinizadas por 3 min con una solución de tripsina-EDTA y sembradas a una densidad de 100,000 células por pozo.

Posteriormente, se les adicionó 50 μ l de una mezcla de transfección que se preparó de la siguiente manera; 1.23 μ g de DNA plasmídico se mezcló con 25 μ l de medio Opti-MEM y Reactivo 1 μ l en un tubo aparte se mezcló 1.5 μ l de lipofectamina 3000 y 25 μ l medio Opti-MEM. Posteriormente, el contenido de ambos tubos se mezcló e incubó 15 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, la mezcla se adicionó a las células que se incubaron por 48 horas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂.

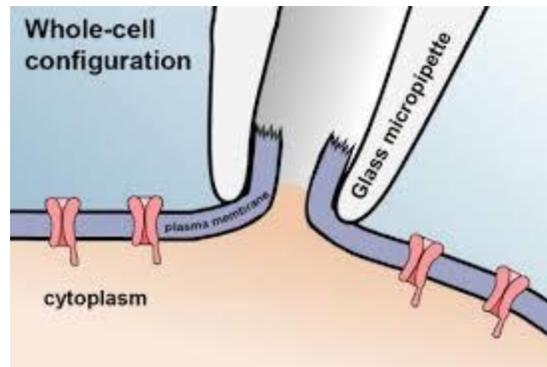
para determinar la eficiencia de transfección de las células se procedió a transfectar las células, empleando el vector pcDNA3.1-EGFP. Este plásmido al ser

incorporado por las células permitió la producción de la Proteína Fluorescente Verde, y con ello identificar a las células transfectadas utilizando un microscopio de fluorescencia.

I. TÉCNICA DE CONTROL DE VOLTAJE (PATCH-CLAMP)

Se usó la técnica de control de voltaje en su modalidad de célula completa para el registro de las corrientes de membrana de las células HEK293. 2-3 días posteriores a la transfección, las células transfectadas sembradas en cubreobjeto fueron transferidas a una cámara de registro instalada en un microscopio invertido convencional (IX71; Olympus, Tokio, Japón). Fueron perfundidas continuamente a temperatura ambiente (22-25 °C). La solución externa estándar utilizada (Attali *et al.*, 1997; Pérez-Samartín *et al.*, 2017) contenía (en mM) 140 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 10 de (4) - (2 hidroxietil) piperazina- ácido 1-etanosulfónico (HEPES), ajustada a pH 7.3 con NaOH. El registro electrofisiológico se realizó utilizando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), para establecer la configuración estándar de célula completa, se utilizaron pipetas de patch-clamp (4-8 MΩ) llenas con solución interna (Pérez-Samartín *et al.*, 2017) que contenía (en mM) 140 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA, 2 Na-ATP, y 0.2 GTP, ajustado a pH 7.3 con KOH. Las corrientes se registraron a un potencial de mantenimiento -80 mV, se digitalizaron con un convertidor analógico a digital (DigiData 1440; Molecular Devices) y se visualizaron y analizaron con software especializado (pClamp v10; Molecular Devices). Las drogas utilizadas fueron aplicadas a las células a través de un sistema de perfusión controlado con válvulas electrónicas. El GABA y los diferentes fármacos fueron agregados a la solución externa a partir de soluciones madre.

Se emplearon GABA, β -CCB, diazepam y zinc. La mayoría de las drogas empleadas en este estudio fueron adquiridas de Tocris Biosciences (Bristol, UK) y GABA de Sigma-Aldrich.



VI. RESULTADOS

A. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES PORTADORES DE SECUENCIAS CODIFICANTES PARA LAS SUBUNIDADES $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ DE RATA Y HUMANO

Con el fin de expresar en las células HEK293 receptores GABA_A constituidos por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ de rata y humano, se construyeron plásmidos recombinantes pcDNA3.1, conteniendo cada una de las secuencias codificantes de las subunidades. Las secuencias codificantes fueron obtenidas por restricción de los plásmidos pXENEX donde previamente se habían clonado las secuencias. Los plásmidos fueron digeridos con las enzimas BamHI y NotI, para hacer la clonación direccional en el plásmido pcDNA3.1.

Después de la restricción, los fragmentos obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa y posteriormente aquellos que contenían las secuencias de las diferentes subunidades, fueron purificados del gel para ligarlos en el vector pcDNA 3.1. Después de la ligación se transformaron bacterias competentes y se seleccionaron algunos candidatos para verificar las construcciones a partir de patrones de restricción y secuenciación.

Como se muestra en la figura 3, después de la restricción de los plásmidos candidatos para cada una de las construcciones, se generaron dos bandas una de 5.4 Kb correspondiente al vector pcDNA 3.1 y otra correspondiente a la secuencia codificante de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\gamma 1$. En 3A podemos observar dos candidatos positivos, que generaron una banda de 5.4Kb y otra de 1425pb correspondiente a la secuencia de la subunidad $\beta 2$ y en la figura 3B podemos observar 4 candidatos positivos para la secuencia $\gamma 1$ que generaron los fragmentos esperados de 5.4 Kb y 1399pb en el caso de las secuencias de rata.

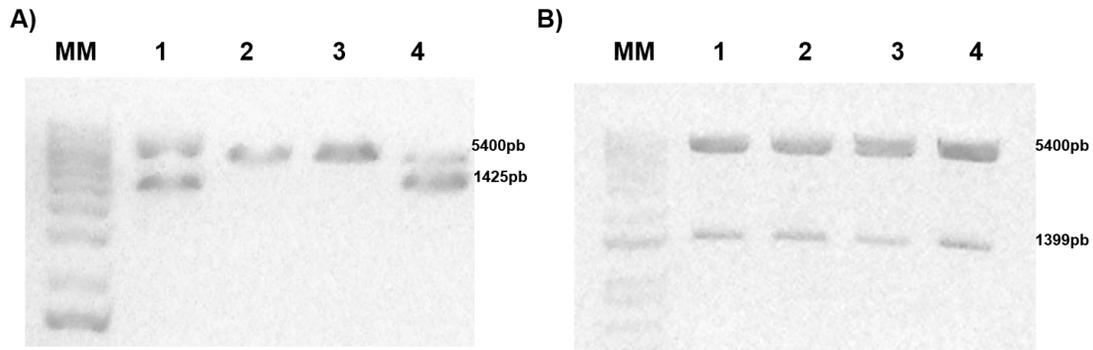


Figura 3. Restricciones de plásmidos candidatos portadores de las secuencias codificantes de las subunidades $\beta 2$ (A) y $\gamma 1$ (B) de rata. Los plásmidos fueron purificados y digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. MM marcador de peso 1 KB, 1-4 productos de restricción de cada candidato. Los fragmentos esperados para los plásmidos recombinantes fueron en A) carriles 1 y 4 de 1425pb para $\beta 2$ y 5.4 pb y en B) carriles 1-4 de 1399pb para $\gamma 1$.

En la Figura 4, se muestra el patrón de restricción de los plásmidos candidatos portadores de cada una de las secuencias de humano. Como se observa, las bandas obtenidas corresponden con el tamaño del vector y de las secuencias de las subunidades; 1479 pb correspondiente a la secuencia codificante de la subunidad $\alpha 3$, 1425 pb correspondiente a la secuencia de la subunidad $\beta 2$ y de 1483 pb para la subunidad $\gamma 1$. Después de corroborar con la restricción las diferentes construcciones, se eligieron los candidatos positivos y se llevó a cabo su secuenciación. El análisis de la secuencia mostró que había un 100% de identidad con las secuencias NM_017069.3, NM_012957.2 y NM_080586.2 correspondientes a las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de rata respectivamente y NM_000808.4, NM_000813.3 y NM_173536.4 para las mismas subunidades de humano.

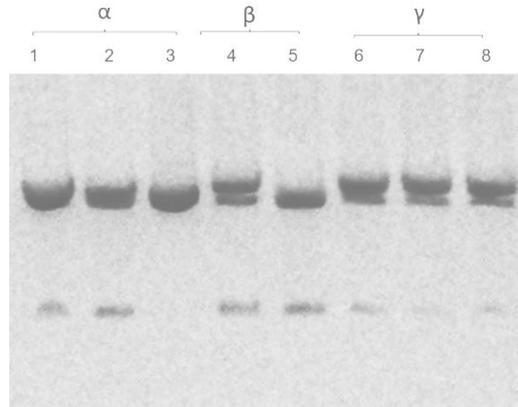


Figura 4. Restricciones de plásmidos recombinantes de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ de Humano. Carriles 1-3 Restricción fragmento subunidad $\alpha 3$ de humano / pcDNA 3.1. Carriles 4 y 5 Restricción fragmento subunidad $\beta 2$ de humano / pcDNA 3.1. Carriles 6-8 restricción fragmento $\gamma 1$ humano/pcDNA 3.1

B. TRANSFECCIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE GABA_A EN CÉLULAS HEK293

Una vez construidos los plásmidos de interés, se procedió a transfectar las células HEK293. Como un primer paso, para determinar la eficiencia de transfección de las células se procedió a transfectar las células HEK293, como se describe en material y métodos, empleando el vector pcDNA3.1-EGFP. Este plásmido al ser incorporado por las células permitió la producción de la Proteína Fluorescente Verde, y con ello identificar a las células transfectadas utilizando un microscopio de fluorescencia.

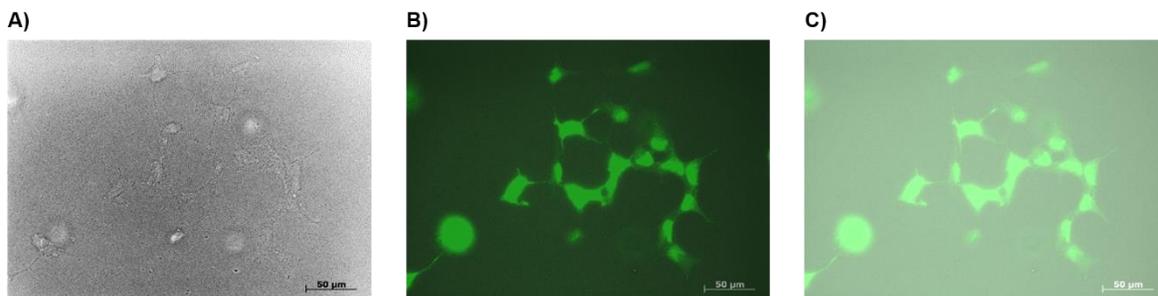


Figura 5. Eficiencia de transfección. A) Campo claro. B) Fluorescencia C) sobreposición de ambos campos.

Para determinar el porcentaje de células transfectadas, se contaron las células en campo claro y las que presentaron fluorescencia (Figura 5). Un porcentaje

alto de células mostraron fluorescencia indicando la correcta transfección y expresión de la EGFP. Fue estimado que la eficiencia de transfección alcanzó el 73%.

C. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR GABA_A DE RATA Y HUMANO EXPRESADO EN CÉLULAS HEK293.

1. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR GABA_A DE RATA

(i) RESPUESTA AL AGONISTA

Una vez transfectadas las células, se procedió a determinar las características electrofisiológicas del receptor GABA_A conformado por las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de rata. Primero, se determinó la relación dosis-respuesta (DR) para GABA y para ello se emplearon diferentes concentraciones del agonista (1, 3, 10, 100 y 300 μM). Se comenzó aplicando la dosis de menor concentración de GABA durante 40 s.

Para cada uno de los receptores expresados, las respuestas a GABA (I) fueron normalizadas con respecto a la amplitud máxima de respuesta (I_{max}), obtenida perfundiendo 300 μM de GABA, mediante la fórmula: $I \% = (I/I_{max}) \times 100$, donde I es la amplitud de la corriente para cada una de las diferentes concentraciones de GABA. Después de la normalización de la respuesta en cada concentración de GABA, se procedió a la construcción de la curva dosis-respuesta (DR) de cada receptor (Figura 6B y 7B), las curvas DR fueron ajustadas por el método de mínimos cuadrados, a la siguiente ecuación logística;

$$y = I_{mín} + \frac{(I_{máx} - I_{mín})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x)}}$$

Donde $I_{mín}$ es la mínima amplitud de corriente relativa obtenida para cada experimento; I_{max} es la máxima amplitud de corriente relativa obtenida para cada

experimento; x son los valores logarítmicos de la concentración dada de GABA; EC_{50} es la concentración que se requiere de GABA para obtener el 50 % de la respuesta de activación, mientras que y es la respuesta normalizada que se obtiene para cada concentración de GABA.

Las curvas DR obtenidas transfectando las subunidades provenientes de rata, mostraron dos grupos con diferentes EC_{50} . Esto indicó que las células HEK293 podrían estar ensamblando dos diferentes receptores (aunque otras explicaciones son posibles) aún y cuando fueron transfectadas con la misma combinación de subunidades. Aquí les llamaremos a estas dos respuestas (R) R1 y R2.

En las figuras 6 y 7 se muestran los trazos representativos obtenidos en la curva DR a GABA para R1 y R2, respectivamente. Hay diferencias notables tanto en la amplitud máxima de la respuesta, como también en la cinética de la corriente generada en cada caso, mientras que las EC_{50} para cada una de las respuestas mostraron una diferencia significativa. La R2 es más sensible al agonista con una EC_{50} de 2 μ M (Figura 7B), en comparación a la R1 que tuvo una EC_{50} de 40 μ M.

La R1 muestra una cinética de apertura (Figura 6) y de desensibilización rápida, mientras que R2 no presentó desensibilización. Debido a estas características podemos proponer que la R1 fue generada a través de la activación de receptores conformados por las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ mientras que la R2 podría ser generada a través de una conformación diferente del receptor, como, por ejemplo, uno que no presentara la subunidad $\gamma 1$, y solo participaran las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 2$.

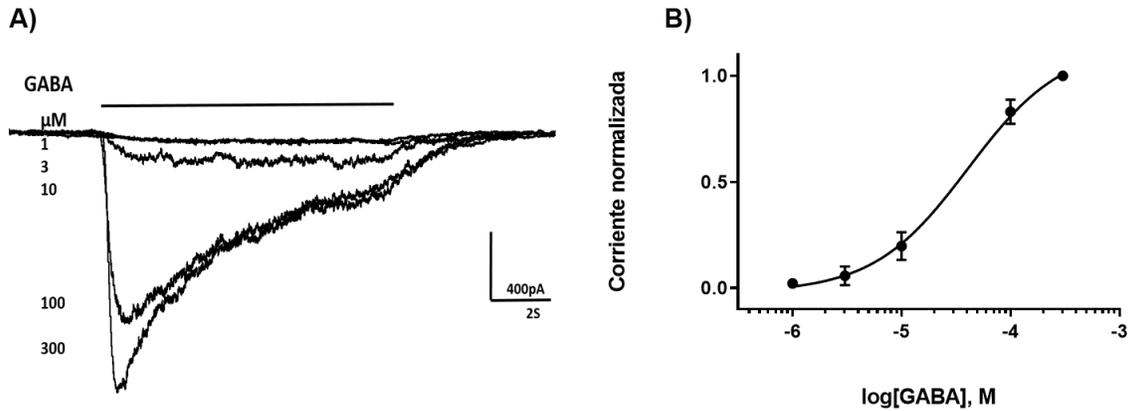


Figura 6. Curva dosis respuesta de R1 a diferentes concentraciones de GABA. A) Trazos de las respuestas a diferentes concentraciones de GABA. **B)** Curva dosis-respuesta a GABA \pm SEM (error estándar de la media) calculado. $n = 5$.

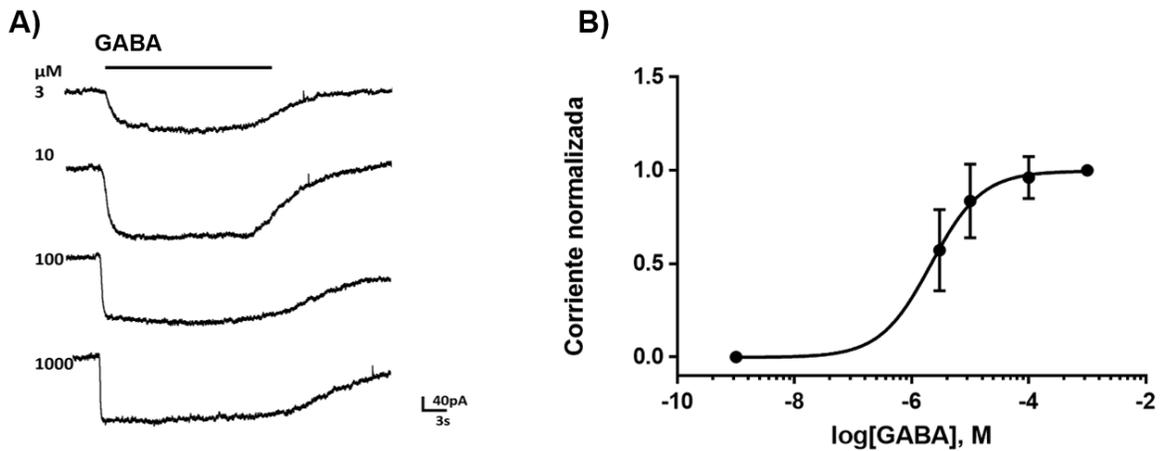


Figura 7. Curva dosis respuesta de R2 a diferentes concentraciones de GABA. A) Trazos de las respuestas a diferentes concentraciones de GABA. **B)** Curva dosis-respuesta a GABA \pm SEM (error estándar de la media) calculado para cada combinación. $n = 5$.

(ii) SENSIBILIDAD A MODULADORES

A continuación, se realizaron experimentos donde se exploró la sensibilidad a diferentes moduladores de los GABA_ARs, esto con dos objetivos principales, primero comparar el efecto de estas drogas con lo observado en los receptores endógenos del OL, y segundo con la finalidad de definir la composición de subunidades que intervienen en la generación de R1 y R2. Así, por ejemplo, a partir de co-aplicaciones de Zinc + GABA, de β-CCB + GABA y de diazepam + GABA estos experimentos tienen el propósito de evidenciar la presencia o ausencia de la subunidad γ1 en los receptores.

El Zn²⁺ es un catión de gran importancia en la fisiología del SNC, entre sus funciones está, el modular la sensibilidad de los receptores de glutamato y de GABA a sus respectivos agonistas. De manera particular el receptor GABA_A que posee la subunidad γ1 es modulado negativamente por este catión (Hosie *et al.*, 2003; Ordaz *et al.*, 2021). En el caso del GABA_AR oligodendroglial la respuesta a su agonista se inhibe en presencia de Zn²⁺ (Arellano *et al.*, 2016).

Con respecto a la β-CCB y diazepam (DZP), estas drogas se unen al sitio de unión entre las vecindades de las subunidades α3 y γ1 modulando de forma positiva o negativa la respuesta al agonista de los receptores que contienen estas subunidades, por lo que la presencia de la subunidad γ1 es esencial para sus efectos.

Las células HEK293 transfectadas fueron tratadas con los moduladores en concentraciones de 10μM y 30μM. En cada caso, las respuestas fueron normalizadas con respecto a la respuesta máxima a GABA (*I_{max}*), obtenida en ausencia del modulador, mediante la siguiente fórmula;

$$I_{\%} = \frac{I}{I_{m\acute{a}x}} 100$$

Respuesta 1.

En la Figura 8 se observa el efecto de los moduladores alostéricos sobre la R1 en células HEK293 transfectadas. La β -CCB provoca una potenciación de la respuesta a GABA del $70 \pm 15.6 \%$, mientras que el Zinc disminuye la respuesta en un $35 \pm 7.6 \%$, en presencia de DZP se observa un efecto positivo incrementando la respuesta en un $27.9 \pm 10\%$,

Este patrón de respuesta es consistente con la presencia de la subunidad $\gamma 1$, y al mismo tiempo mimetiza los efectos observados por estas drogas sobre las respuestas endógenas oligodendrogliales (Arellano *et al.*, 2016).

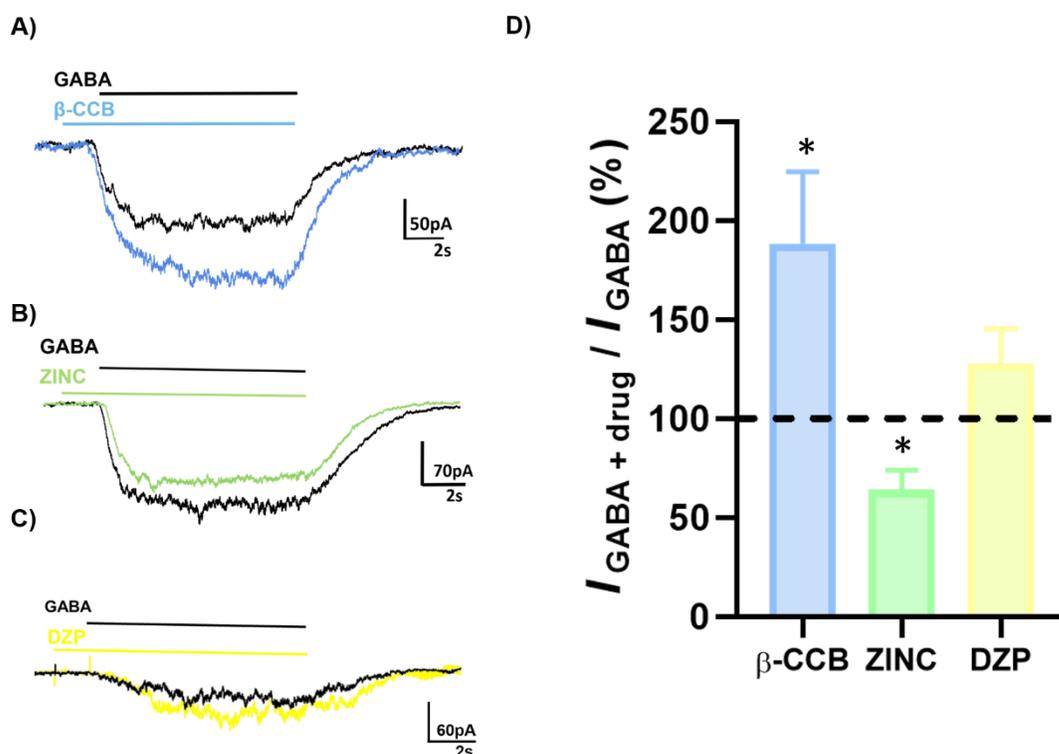


Figura 8. Los trazos indican el efecto provocado por la co-aplicación de GABA con diferentes moduladores alostéricos. Para cada modulador se muestra la respuesta control inducida por GABA y el efecto de la aplicación simultánea. GABA (barra de color negro) y moduladores alostéricos (color). (A) Este gráfico muestra la cuantificación del efecto en la respuesta a GABA de la aplicación simultánea de β -CCB ($10 \mu\text{M}$ β -CCB coaplicados con GABA $10 \mu\text{M}$); (B) Este gráfico muestra la cuantificación del efecto en la respuesta a GABA de la aplicación simultánea de Zinc ($30 \mu\text{M}$ Zinc coaplicados con GABA $30 \mu\text{M}$). C) Se muestra la cuantificación del efecto en la respuesta a GABA de

la aplicación simultánea de DZP (1 μ M de DZP coaplicados con GABA 10 μ M) n=3; D) Gráfica de las respuestas a los moduladores (* P <0,001, prueba t de Student de dos colas emparejadas, significancia con respecto a la respuesta a GABA). Cada efecto fue normalizado con su correspondiente respuesta a GABA control n=6.

Respuesta 2.

En la Figura 9 se observa el efecto de los moduladores alostéricos β -CCB y diazepam sobre la R2. Ni la β -CCB ni diazepam tienen efecto sobre la respuesta a GABA. La coaplicación de Zn²⁺, produjo un porcentaje de inhibición del 15.6 \pm 11.6%, resultado con significancia estadística con respecto al control. Estos resultados sugieren claramente que el receptor involucrado en la generación de la R2 carece del sitio de unión para estas drogas, probablemente se encuentra ausente en él la subunidad γ 1. Estas características no han sido observadas en ninguno de los estudios de las respuestas a GABA reportadas en oligodendrocitos.

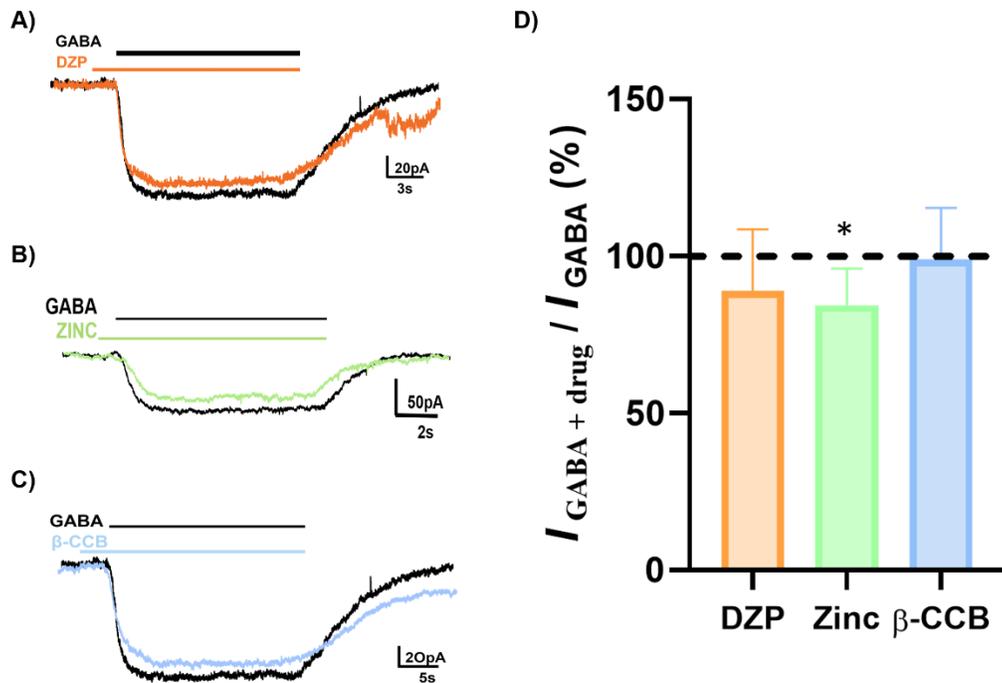


Figura 9. Los trazos ilustran el efecto provocado sobre la R2 de moduladores alostéricos del $GABA_A$ R. Para cada modulador (n = 6 células por modulador) se muestra la respuesta control inducida por GABA y el efecto de la aplicación simultánea. GABA solo (barra negra) y moduladores alostéricos + GABA (barra de color). **(A)** Los trazos muestran la falta de efecto sobre la respuesta a 10 μ M GABA de 5 μ M DZP; **(B)** De manera similar los trazos muestran el efecto de 10 μ M de Zn²⁺ sobre la R2 (n=5). **(C)** Efecto de 10 μ M β -CCB sobre la R2. **(D)** La gráfica resume los efectos de los moduladores (* P <0,001, prueba t de Student de dos colas emparejadas, significancia con respecto

a la respuesta a GABA). Cada efecto fue normalizado con su correspondiente respuesta de GABA control n=6

2. CARACTERÍSTICAS DEL RECEPTOR GABA_A HUMANO

(i) RESPUESTA AL AGONISTA

Dado que de los experimentos anteriores permitieron identificar al receptor (R1) que posiblemente integró a las tres subunidades transfectadas, se procedió a definir las características del receptor GABA_A de humano.

En la figura 10A se ilustran trazos representativos obtenidos en la curva dosis respuesta a GABA del receptor conformado por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ de humano. Las concentraciones de GABA utilizadas fueron de 3, 10, 30 y 300 μM .

En la figura 10B se muestra la curva DR correspondiente, que evidenció una EC_{50} de 32.4 μM .

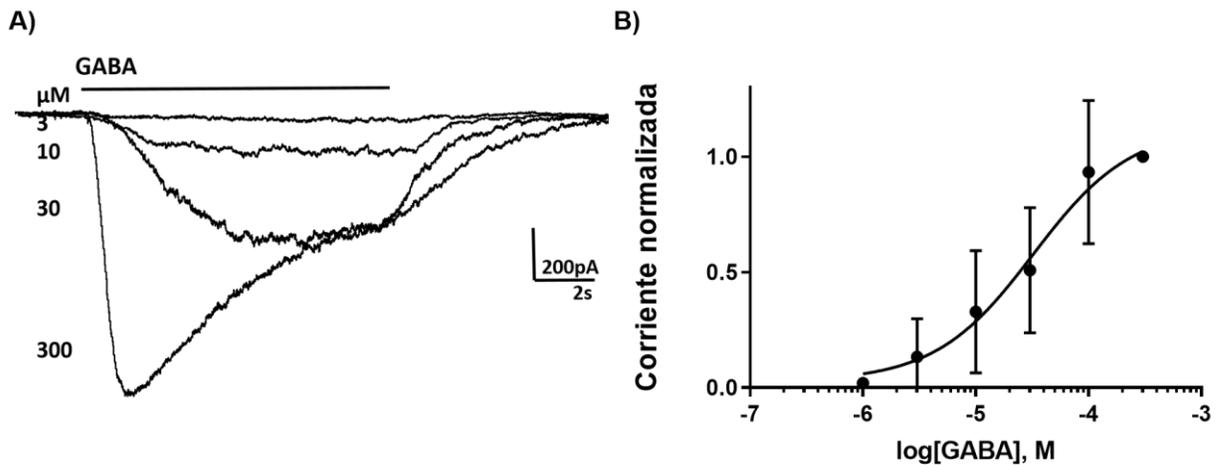


Figura 10. Curva dosis respuesta a diferentes concentraciones de GABA humano. A) Trazos de las respuestas a diferentes concentraciones de GABA. **B)** Curva dosis-respuesta. $n = 3$

(ii) SENSIBILIDAD A MODULADORES

Para definir la sensibilidad del receptor de origen humano a diferentes moduladores, se realizaron experimentos donde se aplicó GABA, o co-aplicaciones de Zinc + GABA y β -CCB + GABA.

En la Figura 11 se observa el efecto de $10\mu\text{M}$ β -CCB la cual potencia la respuesta a GABA casi al triple, mientras que $30\mu\text{M}$ de Zinc tiene un efecto inhibitorio de al menos 50 % de la respuesta al agonista.

En estas respuestas podemos ver características que asemejan lo observado en los receptores endógenos de los oligodendrocitos de rata, cabe mencionar que estos son resultados preliminares con $n = 1$.

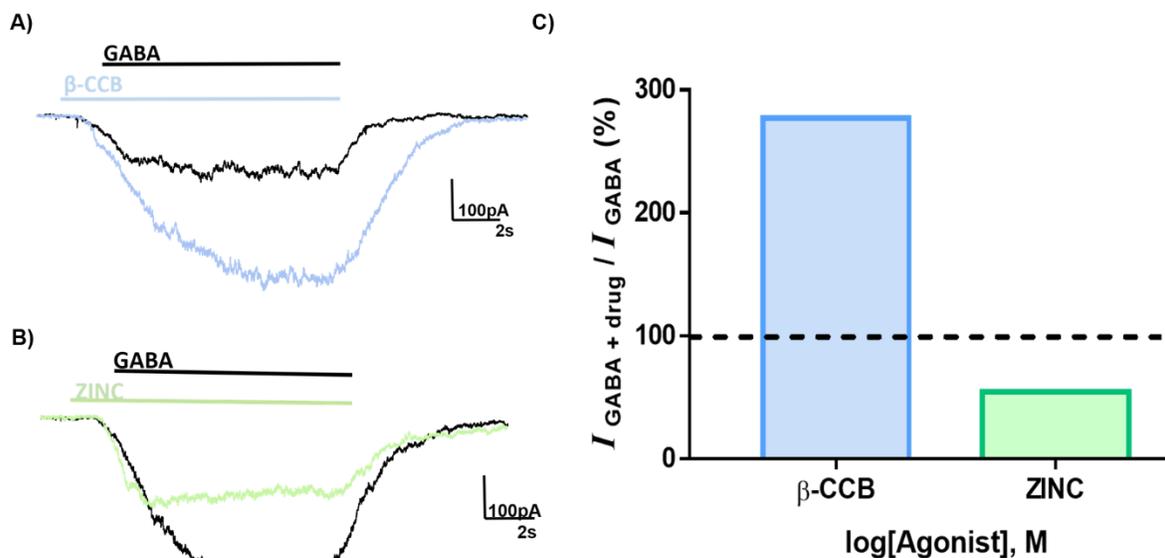


Figura 11. Los trazos ilustran el efecto provocado por dos moduladores alostéricos sobre la respuesta del GABA_AR expresado en células HEK293 transfectadas con subunidades de humano. Para cada modulador se muestra la respuesta control inducida por GABA y el efecto de la aplicación simultánea. GABA (barra negra) y moduladores alostéricos + GABA (barra de color). **(A)** Efecto de $10\mu\text{M}$ β -CCB sobre la respuesta a $10\mu\text{M}$ GABA. **(B)** Efecto de $30\mu\text{M}$ Zn^{2+} sobre la respuesta a $30\mu\text{M}$ de GABA. **(C)** Porcentaje del efecto de los moduladores. Cada efecto fue normalizado con su correspondiente respuesta de GABA control. ($n = 1$)

3. RESPUESTA A LA CO-APLICACIÓN DE β -CCB + FLUMAZENIL EN EL RECEPTOR GABA_A DE RATA Y HUMANO

Como se mencionó previamente (en la sección de antecedentes), una de las diferencias más importantes entre los receptores endógenos oligodendrogiales y los expresados heterológamente en ovocitos de *X. laevis*, es la modulación de β -CCB en presencia de FMZ.

En ese sentido, quisimos determinar si el receptor conformado por las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de rata y humano expresado en células HEK293 compartía las características previamente descritas en ovocitos de *X. laevis* o con las del receptor nativo oligodendrogial.

En la figura 12 se presentan los resultados de las respuestas cuando se co-aplicaron FMZ + β -CCB + GABA a una concentración de 1 μ M, 10 μ M y 10 μ M respectivamente. Como se puede observar, tanto las respuestas del receptor conformado por las subunidades de rata como las de humano (n=1) son modulados positivamente por la β -CCB y esta respuesta no se ve aumentada al aplicar flumazenil.

Estos resultados reproducen mejor el sentido de los efectos observados en el receptor endógeno oligodendrogial, lo que sugiere que las células HEK293 podrían representar un modelo más fiel para estudiar las características del receptor GABA_A oligodendrogial.

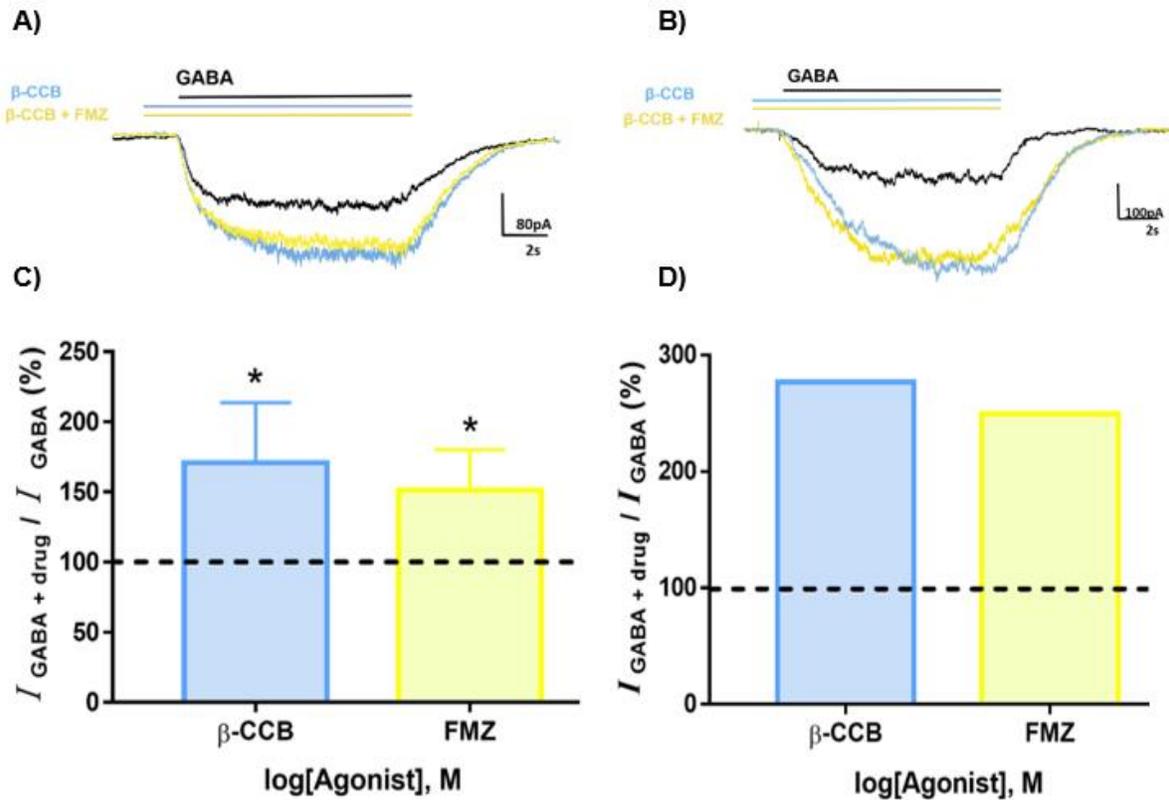


Figura 12. Respuesta del receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ de rata y humano cuando se aplican de forma simultánea GABA + β -CCB y GABA + β -CCB + FMZ. Los trazos ilustran el efecto provocado por dos moduladores alostéricos sobre la respuesta del GABA_AR para cada modulador se muestra la respuesta control inducida por GABA y el efecto de la aplicación simultánea. GABA (barra de color negro) y moduladores alostéricos (color). **(A)** Efecto de la aplicación simultánea correspondientes al receptor de RATA. GABA + β -CCB (Barra azul) y GABA + β -CCB + FMZ (Barra Amarilla). **(B)** Efecto de la aplicación simultánea correspondientes al receptor humano. GABA + β -CCB (Barra azul) y GABA + β -CCB + FMZ (Barra Amarilla). En las graficas se muestra la respuesta control inducida por GABA (línea punteada) y el efecto de la aplicación simultánea. GABA + β -CCB (barra azul) y GABA + β -CCB + FMZ (barra Amarilla). **(C)** Respuestas correspondientes al receptor de RATA (10 μ M β -CCB + GABA 10 μ M coaplicados con FMZ 1 μ M) n=5. (* P < 0,001, prueba t de Student de dos colas emparejadas, significancia con respecto a la respuesta a GABA). **(D)** Respuestas correspondientes al receptor de HUMANO (10 μ M β -CCB + GABA 10 μ M coaplicados con FMZ 1 μ M) n=1.

VII. DISCUSIÓN

En los últimos años han sido descritas las características funcionales de los receptores GABA_A expresados en OLs, los cuales presentan características únicas que los distinguen de los receptores expresados en neuronas y astrocitos (Arellano *et al.*, 2016; Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020; Ordaz *et al.*, 2021). Este receptor presenta afinidad baja a su agonista, es sensible a Zn²⁺ y es modulado positivamente por la β-CCB (Arellano *et al.*, 2016).

Caracterizar el GABA_AR de OLs cobra importancia por su papel en procesos fisiológicos del SN. Nuestro grupo de trabajo cuenta con evidencias que sugieren la participación de la señalización GABAérgica en la comunicación neurona-OL (Arellano *et al.*, 2016). Además, se ha mostrado que el aumento de dicha señalización tiene efectos positivos sobre el proceso de mielinización en diferentes modelos experimentales (Zonouzi *et al.*, 2015; Hamilton *et al.*, 2017; Reyes-Haro *et al.*, 2021). Por ejemplo, los resultados muestran que la administración sistémica de la β-CCB es capaz de promover la remielinización, probablemente a través del aumento de la señalización GABAérgica entre OLs-neuronas en un modelo murino de desmielinización/remielinización (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020).

También, en nuestro laboratorio se tienen evidencias que sugieren que la conformación del receptor GABA_A oligodendroglial está definida por las subunidades α3β2γ1. Los resultados obtenidos a través de la expresión heteróloga de estas subunidades del receptor de rata oligodendroglial en el ovocito de *Xenopus laevis* (Ordaz *et al.*, 2021) muestran un perfil farmacológico que empata al del receptor endógeno de los OLs (Arellano *et al.*, 2016). Si bien las características entre ambos sistemas se reproducen, se puede observar una heterogeneidad cinética y farmacológica importante en respuesta a algunas moléculas y esto puede ser debido a las características propias del ovocito. Con la intención de encontrar un modelo que reproduzca con mayor fidelidad las características del receptor GABA_A de OLs, en este trabajo empleamos a las células de mamífero HEK293 como modelo de expresión heteróloga. Para ello, las secuencias codificantes de las subunidades α3, β2 y γ1 de rata y humano fueron clonadas en el vector pcDNA3 y transfectadas de

manera transitoria en dichas células. Las características farmacológicas de los receptores se determinaron empleando la técnica de control de voltaje en su modalidad de célula completa.

A. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES EXPRESADO

Diversos trabajos han evidenciado que cuando las subunidades α , β y γ se expresan en una proporción de 1:1:1 en células HEK293, se observa la expresión de mezclas de receptores conteniendo las subunidades $\alpha\beta$ y $\alpha\beta\gamma$ (Tretter *et al.*, 1997; Boileau *et al.*, 2002a; Has & Chebib, 2018). Por ello, en este trabajo se sobreexpresó el ADNc de la subunidad γ en la transfección transitoria con las subunidades $\alpha3$, $\beta2$ y $\gamma1$ de rata y humano en una proporción 1:1:6. Aún bajo ese contexto, los receptores expresados comprendían dos conformaciones basados en sus características farmacológicas. Se observó que un tipo de receptor presentaba una EC_{50} para GABA de $2\mu\text{M}$ y una desensibilización lenta. Es decir, en presencia del agonista a una baja concentración el receptor se mantiene abierto, produciendo una desensibilización lenta que evidencian su alta sensibilidad al agonista. Se ha demostrado que la conformación $\alpha\beta$ del receptor GABA_A presenta un $EC_{50} < 20\mu\text{M}$ y una desensibilización lenta (Boileau *et al.*, 2005; Ordaz *et al.*, 2021) resultados cercanos a lo observado en este trabajo. Además, para este receptor la aplicación de moduladores como el DZP y la β -CCB no mostró ningún efecto, lo que sugiere la ausencia del sitio de unión a BZD, sitio de acción de ambas moléculas que involucra las subunidades α y γ (Rogers *et al.*, 1994; Sigel y Buhr, 1997; Sigel, 2002; Böhme *et al.*, 2004; Sigel y Lüscher, 2011; Sieghart *et al.*, 2018;). Estos resultados sugieren que el receptor con estas características está conformado únicamente por las subunidades $\alpha3$ y $\beta2$.

El otro tipo de receptor mostró, en el caso de la rata, una EC_{50} a GABA de $40\mu\text{M}$, una desensibilización rápida y evidente, y una respuesta máxima a $300\mu\text{M}$, mientras que el de humano, mostró un EC_{50} de $32\mu\text{M}$ y una desensibilización notoria. Ambas respuestas son similares a la reportada para GABA en células

oligodendrogiales (Arellano *et al.*, 2016) y al receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* (Ordaz *et al.*, 2021).

B. EFECTO EN PRESENCIA DE ZINC

La sensibilidad al ion Zn^{2+} es otra de las características que estudiamos en los receptores de rata y humano expresados en las células HEK293. La sensibilidad media a Zn^{2+} de estos receptores se debe a que dos de los tres sitios de unión están interrumpidos por la inclusión de la subunidad γ en el ensamblaje de los receptores. Los receptores de rata y humano aquí estudiados, mostraron una inhibición del $35 \pm 7.6\%$ y 50% respectivamente en presencia de Zn^{2+} . Bajo ese contexto, los resultados observados son cercanos a lo reportado por Ordaz y colaboradores (2021), quien reportó una inhibición por zinc del 40% y del 50% para el receptor $GABA_A \alpha 3\beta 2\gamma 1$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* y para el receptor endógeno oligodendrogial, respectivamente (Arellano *et al.*, 2016). En este sentido, el receptor humano, presenta características que se asemejan más a las del receptor endógeno oligodendrogial de rata. Es de resaltar que este trabajo muestra por primera vez la modulación por Zn^{2+} del receptor GABA humano conformado por las subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$.

C. MODULADORES

Para obtener más información sobre la utilidad de las células HEK293 como modelo de estudio para caracterizar al receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$, también se empleó una batería de moduladores alostéricos de los $GABA_A R$ cuya respuesta fue evaluada previamente en el receptor endógeno OL y en el expresado en ovocitos del *Xenopus laevis*.

El primer análisis se hizo aplicando GABA y DZP, una benzodiazepina clásica, encontrando una potenciación de la respuesta a GABA del $127\% \pm 10\%$, algo alejado a lo observado en *X. laevis*, donde se observó una potenciación del $198\% \pm 37.2\%$

en presencia del fármaco. Para el receptor endógeno de rata se reportó una potenciación del $159.5 \% \pm 5 \%$. Esta respuesta en las células HEK293 se acerca a lo observado en el receptor endógeno oligodendroglial. Los valores para el receptor conformado por las subunidades humanas no fueron obtenidos.

Como se mencionó previamente, una característica distintiva del receptor oligodendroglial es su modulación positiva por la β -carbolina β -CCB (Arellano *et al.*, 2016), al igual como ocurre con el receptor expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* (Ordaz *et al.*, 2021). El nivel de potenciación por β -CCB sobre el receptor endógeno es de $237 \% \pm 21 \%$, mientras que el expresado en *X. laevis* fue de $236.4 \% \pm 40 \%$. En el caso de las células HEK293 la potenciación fue de $188.52 \% \pm 12.81 \%$ para el receptor de rata. Este valor sugiere que las HEK293 presentan una respuesta más cercana a lo observado previamente en el receptor endógeno y en *X. laevis*. Por otro lado, la potenciación por β -carbolina para el receptor humano fue de 277% , cercano a los datos observados en el receptor endógeno, es preciso mencionar que solo fue un ensayo.

Una característica que distingue la respuesta del GABA_AR endógeno, con el expresado en *X. laevis*, es su respuesta a GABA en presencia de β -CCB y FMZ. En *X. laevis*, se observa que la respuesta potenciadora a GABA en presencia de β -CCB se incrementa al aplicar $1 \mu\text{M}$ de FMZ mientras que en el receptor endógeno OL, la respuesta potenciadora de la β -CCB no se ve modificada.

Al analizar la respuesta a GABA de los GABA_AR tanto de rata como de humano expresados en las células HEK293, en presencia de β -CCB y FMZ, se observa que la respuesta se potencia en presencia de β -CCB, pero con FMZ no se modifica. Esta respuesta es comparable al del receptor endógeno oligodendroglial.

Es probable que las diferencias encontradas en las respuestas de los receptores GABA_AR endógeno y los expresados en los sistemas heterólogos se deba a las características propias de las células.

En la actualidad hay una variedad importante de modelos de expresión heteróloga procariontes y eucariotes. Desde 1982, los ovocitos de la rana sudafricana *Xenopus laevis* es uno de los sistemas más utilizados (Miledi *et al.*, 1982a; Miledi *et*

al., 1982b; Wagner *et al.*, 2000; Sigel & Minier, 2005). Presenta la ventaja de ser fácil de manipular, una expresión robusta y grabaciones estables de canales iónicos en un entorno libre de actividad eléctrica endógena (Li *et al.*, 2001; Bianchi & Driscoll, 2006). Sin embargo, las propiedades biofísicas de los ovocitos, como sus componentes de membrana pueden disminuir la accesibilidad de los fármacos debido a la gran cantidad de invaginaciones en la membrana, la membrana vitelina que rodea la superficie del ovocito o las células del folículo (Li *et al.*, 2001; Boileau *et al.*, 2005; Orsini *et al.*, 2010; Sobczak *et al.*, 2010). Muchos de estos inconvenientes pueden evitarse, al menos parcialmente, mediante el uso de células de mamíferos como huésped de expresión de proteínas recombinantes. Una de estas células son la línea celular HEK293, uno de los sistemas de expresión preferidos para producir proteínas glicosiladas complejas (Thomas & Smart, 2005; Hou *et al.*, 2020).

Normalmente, los estudios de expresión se limitan al uso de un solo sistema de expresión, lo que dificulta obtener conclusiones sobre cuál es el mejor sistema de expresión para una proteína de membrana en particular. En este sentido nuestros primeros esfuerzos se dirigieron a expresar el GABA_AR oligodendroglial en un modelo que reproduzca cercanamente las condiciones en las que se encuentra inmersa la proteína de interés, utilizando las células de mamífero HEK293 y con ello complementar la descripción y caracterización farmacológica del receptor GABA_A de OLs.

Las respuestas farmacológicas obtenidas expresando el receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ de rata y humano en células HEK293 mostraron un comportamiento similar al observado en el receptor endógeno oligodendroglial.

Como se mencionó, la principal diferencia observada entre el receptor nativo de los OL y el expresado en sistema heterólogo de anfibio, fue la respuesta a GABA en presencia de β -CCB y FMZ. El receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ expresado en ovocitos, presenta un aumento en la respuesta a β -CCB en presencia de FMZ, efecto que no se observa en el receptor endógeno de OL (Arellano *et al.*, 2016). En las células HEK293, tanto el receptor de rata como el humano se comportan como el endógeno. Por ello, las

células HEK293 representan un buen modelo de expresión heteróloga para el receptor GABA_A oligodendroglial de rata y humano, pues permite caracterizar con fidelidad el receptor oligodendroglial.

Sin embargo, hay que considerar que tal vez una limitante en el empleo de estas células sea la diversidad de ensamblajes del receptor que se producen en estas células, como se pudo observar en este trabajo (Fig. 7 y 8).

Por otro lado, la expresión de proteínas recombinantes en ovocitos de *Xenopus laevis* representa un sistema de expresión rápido y eficaz, por ello emplear ambos sistemas de expresión heteróloga nos permiten complementar la información obtenida y caracterizar de forma robusta y confiable las características del receptor GABA_A oligodendroglial.

Una posibilidad para confirmar los resultados obtenidos en este trabajo, sería el trasplante de los receptores GABA_A oligodendroglial de rata y humano expresados en las células HEK293 en la membrana de ovocitos de *X. laevis*, ya que, de esta manera, permanecen embebidas en su membrana celular, manteniendo de esta manera sus características estructurales, estequiométricas y, además, el conjunto de posibles proteínas y lípidos asociados a ellos (Marsal *et al.*, 1995).

VIII. CONCLUSIONES

Se construyeron plásmidos recombinantes con las secuencias codificantes de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de rata y humano. En las células HEK293, se obtuvieron dos tipos de respuesta, una parece ser generada a través de la activación de receptores que contienen a la subunidad $\gamma 1$ y la segunda por la activación de un receptor que no contiene la subunidad γ .

- Los receptores expresados en células HEK293 conformado por las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de rata y humano mimetizan las características farmacológicas y electrofisiológicas del receptor endógeno oligodendroglial
- Las células HEK293 representan un buen modelo de expresión heteróloga y brinda una herramienta para caracterizar estructural y farmacológicamente al receptor GABA_A.

IX. LITERATURA CITADA

- Ailor**, E., & Betenbaugh, M. J. (1999). Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Current opinion in biotechnology*, 10(2), 142-145.
- Albert**, A. D., Young, J. E., & Yeagle, P. L. (1996). Rhodopsin-cholesterol interactions in bovine rod outer segment disk membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1285(1), 47-55.
- Allen**, N. J., & Lyons, D. A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6411), 181–185.
- Anand**, R. D., Sertil, O., & Lowry, C. V. (2004). Restriction digestion monitors facilitate plasmid construction and PCR cloning. *BioTechniques*, 36(6), 982-985.
- Arena**, T. A., Harms, P. D., & Wong, A. W. (2018). High throughput transfection of HEK293 cells for transient protein production. In *Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells* (pp. 179-187). Humana Press, New York, NY.
- Arellano**, R. O., Sánchez-Gómez, M. V., Alberdi, E., Canedo-Antelo, M., Chara, J. C., Palomino, A. & Matute, C. (2016). Axon-to-glia interaction regulates GABAA receptor expression in oligodendrocytes. *Molecular pharmacology*, 89(1), 63-74.
- Attali** B, Wang N, Kolot A, Sobko A, Cherepanov V and Soliven B (1997). Characterization of delayed rectifier Kv Channel in oligodendrocytes and progenitor cells. *J Neurosci* 17:8234-8245.
- Bai**, X., Kirchhoff, F., & Scheller, A. (2021). Oligodendroglial GABAergic signaling: more than inhibition!. *Neuroscience bulletin*, 37(7), 1039-1050.
- Barres**, B. A., & Raff, M. C. (1993). Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature*, 361(6409), 258-260.

- Barres, B. A., & Raff, M. C. (1999).** Axonal control of oligodendrocyte development. *The Journal of cell biology*, 147(6), 1123-1128.
- Baulieu, E. E., & Schumacher, M. (1997).** Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone on myelination in peripheral nerves. *Multiple Sclerosis Journal*, 3(2), 105-112.
- Boileau, A. J., Pearce, R. A., & Czajkowski, C. (2005).** Tandem subunits effectively constrain GABA_A receptor stoichiometry and recapitulate receptor kinetics but are insensitive to GABA_A receptor-associated protein. *Journal of Neuroscience*, 25(49), 11219-11230.
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001).** Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*.
- Bettler, B., K. Kaupmann, J. Mosbacher y M. Gassmann (2004):** Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors. *Physiological Reviews* 84: 835-867.
- Bieberich E. (2018).** Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. *Chemistry and physics of lipids*, 216, 114–131.
- Boesze-Battaglia, K. & Schimmel, R. (1997).** Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *Journal of experimental biology*, 200(23), 2927-2936.
- Böhme I, Rabe H, and Lüddens H. (2004)** Four amino acids in the α subunits determine the γ -aminobutyric acid sensitivities of GABA_A receptor subtypes. *J Biol Chem* 279:35193–35200.
- Boiko, T., & Winckler, B. (2006).** Myelin under construction -- teamwork required. *The Journal of cell biology*, 172(6), 799–801.
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010).** Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 37-53.

- Butt**, A. M. (2013): Structure and function of oligodendrocytes. En: Kettenmann, H. y B.R. Ransom (eds.), *Neuroglia*. pp 62-73. Oxford University Press. New York.
- Campagnoni**, A. T., & Macklin, W. B. (1988). Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Molecular neurobiology*, 2(1), 41-89.
- Cisneros-Mejorado** Abraham J., Garay Edith, Ortiz-Retana Juan, Concha Luis, Moctezuma Juan P., Romero Samuel, Arellano O. Rogelio (2020). Demyelination–Remyelination of the Rat Caudal Cerebellar Peduncle Evaluated with Magnetic Resonance Imaging, *Neuroscience*, Volume 439, 255-267, ISSN 0306-4522.
- Dalton**, A. C., & Barton, W. A. (2014). Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein science*, 23(5), 517-525.
- Davies**, P. A., Hoffmann, E. B., Carlisle, H. J., Tyndale, R. F., & Hales, T. G. (2000). The influence of an endogenous $\beta 3$ subunit on recombinant GABAA receptor assembly and pharmacology in WSS-1 cells and transiently transfected HEK293 cells. *Neuropharmacology*, 39(4), 611-620.
- Demain**, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306.
- Dumont**, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), 1110–1122.
- Fantini**, J., & Barrantes, F. J. (2009). Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(11), 2345-2361.
- Fields** R. D. (2014). Neuroscience. Myelin--more than insulation. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6181), 264–266.

- Gilbert**, P., Kettenmann, H., & Schachner, M. (1984). Gamma-aminobutyric acid directly depolarizes cultured oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience*, 4(2), 561-569.
- Gomes**, A. R., Byregowda, S. M., Veeregowda, B. M., & Balamurugan, V. (2016). An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 4(7), 346-356.
- Graham**, F. L., Smiley, J., Russell, W. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of general virology*, 36(1), 59-72.
- Greenfield Jr**, L. J. (2013). Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABAA receptors. *Seizure*, 22(8), 589-600.
- Gudz**, T. I., Komuro, H., & Macklin, W. B. (2006). Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an α v integrin/myelin proteolipid protein complex. *Journal of Neuroscience*, 26(9), 2458-2466.
- Gyllensten** L, Malmfors T. Myelination of the optic nerve, its dependence on visual function: a quantitative investigation in mice. *J Embryol Exp Morphol*. 2009; 11:255–256.
- Hamilton**, N. B., Clarke, L. E., Arancibia-Carcamo, I. L., Kougioumtzidou, E., Matthey, M., Káradóttir, R., Whiteley, L., Bergersen, L. H., Richardson, W. D., & Attwell, D. (2017). Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia*, 65(2), 309–321.
- Hanson**, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T., Roth, C. B., Jaakola, V. P., Chien, E. Y. & Stevens, R. C. (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human β 2-adrenergic receptor. *Structure*, 16(6), 897-905.
- Harrison**, R. L., & Jarvis, D. L. (2007). Transforming lepidopteran insect cells for improved protein processing. In *Baculovirus and insect cell expression protocols* (pp. 341-356). Humana Press.

- Hartl**, F.U. y Hayer-Hartl, M. (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain a folded protein". *Science* 295, p. 1852-1858.
- Has**, A. T., & Chebib, M. (2018). GABA receptors: Various stoichiometrics of subunit arrangement in $\alpha 1\beta 3$ and $\alpha 1\beta 3\epsilon$ receptors. *Current pharmaceutical design*, 24(17), 1839-1844.
- Hayashi**, C., & Suzuki, N. (2019). Heterogeneity of Oligodendrocytes and Their Precursor Cells. In *Myelin* (pp. 53-62). Springer, Singapore.
- Henin** J.; Salari R.; Murlidaran S.; Brannigan G. A Predicted Binding Site for Cholesterol on the Gaba(a) Receptor. *Biophys. J.* 2014, 106, 1938–1949.
- Hosie**, A. M., Dunne, E. L., Harvey, R. J., & Smart, T. G. (2003). Zinc-mediated inhibition of GABA receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nature neuroscience*, 6(4), 362-369.
- Hou** X., Zhang D., Yuvaraj J. K., Corcoran J. A., Andersson M. N., Löfstedt C. (2020) Functional characterization of odorant receptors from the moth *Eriocrania semipurpurella*: A comparison of results in the *Xenopus* oocyte and HEK cell systems. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 117: 103289.
- Hu**, J., Han, J., Li, H., Zhang, X., Ian Liu, L., Chen, F., & Zeng, B. (2018). Human embryonic kidney 293 cells: a vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology. *Cells Tissues Organs*, 205(1), 1-8.
- Huang**, Z., Li, G., Pei, W., Sosa, L. A., & Niu, L. (2005). Enhancing protein expression in single HEK 293 cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 142(1), 159-166.
- Káradóttir**, R., & Attwell, D. (2007). Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience*, 145(4), 1426-1438.
- Klein**, U., Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (1995). Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with. Beta.-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*, 34(42), 13784-13793.

- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019).** Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. *Cells*, 8(11), 1424.
- Chan, J. R. (2012). A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nature methods*, 9(9), 917–922. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2105>
- Li, P., Gao, X. G., Arellano, R. O., & Renugopalakrishnan, V. (2001).** Glycosylated and phosphorylated proteins—expression in yeast and oocytes of *Xenopus*: prospects and challenges—relevance to expression of thermostable proteins. *Protein expression and purification*.
- Luyt, K., Slade, T. P., Dorward, J. J., Durant, C. F., Wu, Y., Shigemoto, R. & Molnár, E. (2007).** Developing oligodendrocytes express functional GABA_B receptors that stimulate cell proliferation and migration. *Journal of neurochemistry*, 100(3), 822-840.
- Marinelli, C., Bertalot, T., Zusso, M., Skaper, S. D., & Giusti, P. (2016).** Systematic review of pharmacological properties of the oligodendrocyte lineage. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 27.
- Marsal, J., Tigyi, G., & Miledi, R. (1995).** Incorporation of acetylcholine receptors and Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), 5224–5228.
- McKernan, R. M., & Whiting, P. J. (1996).** Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends in neurosciences*, 19(4), 139–143.
- McTigue, D. M., & Tripathi, R. B. (2008).** The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of neurochemistry*, 107(1), 1-19.
- Miledi, R. (1982).** A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 215(1201), 491-497.

- Miledi, R., & Woodward, R. M. (1989).** Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology*, 416(1), 601-621.
- Nettleship, J. E., Watson, P. J., Rahman-Huq, N., Fairall, L., Posner, M. G., Upadhyay, A., & Owens, R. J. (2015).** Transient expression in HEK 293 cells: an alternative to *E. coli* for the production of secreted and intracellular mammalian proteins. *Insoluble proteins*, 209-222.
- Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., & Gehring, C. (2016).** A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization. *Frontiers in physiology*, 7, 300.
- Olsen R. W., Sieghart W. (2008).** International Union of Pharmacology. Subtypes of gamma-aminobutyric Acid receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology and function. Update. *Pharmacological Review*. 60, 243–260. 10.1124/pr.108.00505.
- Opekarova, M., & Tanner, W. (2003).** Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1610(1), 11-22.
- Ordaz P., Garay E., Limon A., Pérez-Samartín A., Sánchez-Gómez M. V., Robles-Martínez L., Cisneros-Mejorado A., Matute C., Arellano R.O. (2020).** Oligodendrocyte GABA_A receptors expressed in the neonatal rat contain $\alpha 3$ and $\gamma 1$ subunits and present differential functional and pharmacological properties. *Molecular Pharmacology*. Mol Pharmacol
- Orsini, F., Santacroce, M., Arosio, P., & Sacchi, V. F. (2010).** Observing *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane by atomic force microscopy. *Methods*, 51(1), 106-113.
- Othman, T., Yan, H., & Rivkees, S. A. (2003).** Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia*, 44(2), 166-172.

- Paila**, Y. D., Tiwari, S., & Chattopadhyay, A. (2009). Are specific nonannular cholesterol binding sites present in G-protein coupled receptors? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(2), 295-302.
- Pérez-Cerdá**, F., Sánchez-Gómez, M. V., & Matute, C. (2015). Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Frontiers in neuroanatomy*, 9, 92.
- Pérez-Samartín**, A., Garay, E., Moctezuma, JPH, Cisneros-Mejorado, A., Sánchez-Gómez, MV, Martel-Gallegos, G., y Arellano, RO (2017). Las corrientes de K⁺ rectificadoras hacia el interior en oligodendrocitos cultivados del nervio óptico de rata son insensibles al pH. *Investigación neuroquímica*, 42 (9), 2443-2455.
- Phillips**, R., Ursell, T., Wiggins, P., & Sens, P. (2009). Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*, 459(7245), 379–385.
- Poitelon**, Y., Kopec, A. M., & Belin, S. (2020). Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells*, 9(4), 812.
- Pucadyil**, T. J., & Chattopadhyay, A. (2004). Cholesterol modulates ligand binding and G-protein coupling to serotonin1A receptors from bovine hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1663(1-2), 188-200.
- Pudasaini**, S., Friedrich, V., Bühner, C., Endesfelder, S., Scheuer, T., & Schmitz, T. (2022). Postnatal myelination of the immature rat cingulum is regulated by GABAB receptor activity. *Developmental neurobiology*, 82(1), 16-28.
- Pulix**, M., Lukashchuk, V., Smith, D. C., & Dickson, A. J. (2021). Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 71, 18-24.
- Reyes-Haro**, D., Cisneros-Mejorado, A., & Arellano, R. O. (2021). Therapeutic Potential of GABAergic Signaling in Myelin Plasticity and Repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 763.

- Richter, L., De Graaf, C., Sieghart, W., Varagic, Z., Mörzinger, M., De Esch, I. J., & Ernst, M. (2012).** Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. *Nature chemical biology*, 8(5), 455-464.
- Risselada H. J. (2019).** Cholesterol: The Plasma Membrane's Constituent that Chooses Sides. *Biophysical journal*, 116(12), 2235–2236.
- Rogers, C. J., Twyman, R. E., & Macdonald, R. L. (1994).** Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *The Journal of Physiology*, 475(1), 69-82.
- Schmitt, S., Castelvetti, L. C., & Simons, M. (2015).** Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(8), 999-1005.
- Sequeira, A., Shen, K., Gottlieb, A., & Limon, A. (2019).** Human brain transcriptome analysis finds region-and subject-specific expression signatures of GABA AR subunits. *Communications biology*, 2(1), 1-14.
- Serrano-Regal, M. P., Bayón-Cordero, L., Ordaz, R. P., Garay, E., Limon, A., Arellano, R. O. & Sánchez-Gómez, M. V. (2020).** Expression and function of GABA receptors in myelinating cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14.
- Serrano-Regal, M. P., Luengas-Escuza, I., Bayón-Cordero, L., Ibarra-Aizpurua, N., Alberdi, E., Pérez-Samartín, A., & Sánchez-Gómez, M. V. (2020).** Oligodendrocyte differentiation and myelination is potentiated via GABA_B receptor activation. *Neuroscience*, 439, 163-180.
- Sieghart W., Savić M. M. (2018).** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. GABA_A receptor subtype- and function-selective ligands: key issues in translation to humans. *Pharmacol. Rev.* 70, 836–878. 10.1124/pr.117.014449
- Sigel, E. (2002).** Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA-A receptors. *Current topics in medicinal chemistry*, 2(8), 833-839.

- Sigel, E., & Buhr, A. (1997).** The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 18(4), 425-429.
- Sigel, E., & Minier, F. (2005).** The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Molecular nutrition & food research*, 49(3), 228-234.
- Sigel, E., & P Luscher, B. (2011).** A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABAA receptors. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(2), 241-246.
- Simons, M., & Trajkovic, K. (2006).** Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of cell science*, 119(21), 4381-4389.
- Sinha, R., Grimes, W. N., Wallin, J., Ebbinghaus, B. N., Luu, K., Cherry, T., & Hoon, M. (2021).** Transient expression of a GABA receptor subunit during early development is critical for inhibitory synapse maturation and function. *Current Biology*, 31(19), 4314-4326.
- Sobczak, K., Bangel-Ruland, N., Leier, G., & Weber, W. M. (2010).** Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods*, 51(1), 183-189.
- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., & Fields, R. D. (2002).** Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*, 36(5), 855-868.
- Swiech, K., Picanço-Castro, V., & Covas, D. T. (2012).** Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein expression and purification*, 84(1), 147-153.
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005).** HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 51(3), 187-200.

- Tomassy, G. S., Dershowitz, L. B., & Arlotta, P. (2016).** Diversity matters: a revised guide to myelination. *Trends in cell biology*, *26*(2), 135-147.
- Tretter, V., Ehya, N., Fuchs, K., & Sieghart, W. (1997).** Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *Journal of Neuroscience*, *17*(8), 2728-2737.
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008).** Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology*, *9*(2), 112-124.
- Van Tilborg, E., de Theije, C., van Hal, M., Wagenaar, N., de Vries, L. S., Benders, M. J., Rowitch, D. H., & Nijboer, C. H. (2018).** Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia*, *66*(2), 221–238.
- Vélez-Fort M., Audinat E., Angulo M. C. (2012).** Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neuroscientist* *18*, 237–250. 10.1177/1073858411403317.
- Velumian, A., & Samoiloova, M. (2014).** White Matter: Basic Principles of Axonal Organization and Function. In *White Matter Injury in Stroke and CNS Disease* (pp. 3-38). Springer, New York, NY.
- Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F., & Bröer, S. (2000).** The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *10*(1-2), 1-12.
- Wang, C., Pralong, W. F., Schulz, M. F., Rougon, G., Aubry, J. M., Pagliusi, S., & Kiss, J. Z. (1996).** Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *The Journal of cell biology*, *135*(6), 1565-1581.

- Wang, H., Yan, Y., Kintner, D. B., Lytle, C., & Sun, D. (2003).** GABA-mediated trophic effect on oligodendrocytes requires Na-K-2Cl cotransport activity. *Journal of neurophysiology*, 90(2), 1257-1265.
- Warf, B. C., Fok-Seang, J. & Miller, R. H. (1991).** Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 11(8), 2477-2488.
- Wilkins, A., Majed, H., Layfield, R., Compston, A., & Chandran, S. (2003).** Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 4967-4974.
- Yang J., Cheng Q., Takahashi A., Goubaeva F. (2006).** Kinetic Properties of GABA r1 Homomeric Receptors Expressed in HEK293 Cells. *Biophysical Journal* 91, 2155–2162.
- Young, K. M., Psachoulia, K., Tripathi, R. B., Dunn, S. J., Cossell, L., Attwell, D. & Richardson, W. D. (2013).** Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron*, 77(5), 873-885.
- Zhang, Y., Baycin-Hizal, D., Kumar, A., Priola, J., Bahri, M., Heffner, K. M., & Betenbaugh, M. J. (2017).** High-throughput lipidomic and transcriptomic analysis to compare SP2/0, CHO, and HEK-293 mammalian cell lines. *Analytical chemistry*, 89(3), 1477-1485.
- Zonouzi M., Scafidi J., Li P., McEllin B., Edwards J., Dupree J. L., et al. . (2015).** GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nat. Neurosci.* 18, 674–682. 10.1038/nn.3990

X. Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Modelo Receptor GABA _A | 17 |
| Figura 2. Simulación molecular de la membrana plasmática..... | 21 |
| Figura 3. Restricciones de plásmidos candidato portadores de las secuencias codificantes de las subunidades β 2 (A) y γ 1 (B) de rata.. .. | 32 |
| Figura 4. Restricciones de plásmidos recombinantes de las subunidades α 3, β 2 de Humano. | 33 |
| Figura 5. Eficiencia de transfección..... | 33 |
| Figura 6. Curva dosis respuesta de R1 a diferentes concentraciones de GABA.. .. | 36 |
| Figura 7. Curva dosis respuesta de R2 a diferentes concentraciones de GABA.. .. | 36 |
| Figura 8. Los trazos indican el efecto provocado sobre R1 de la co-aplicación de GABA con diferentes moduladores alostéricos..... | 38 |
| Figura 9. Los trazos ilustran el efecto provocado sobre la R2 de moduladores alostéricos del GABA _A R.. .. | 39 |
| Figura 10. Curva dosis respuesta a diferentes concentraciones de GABA humano..... | 40 |
| Figura 11. Los trazos ilustran el efecto provocado por dos moduladores alostéricos sobre la respuesta del GABAAR expresado en células HEK transfectadas con subunidades de humano..... | 41 |
| Figura 12. Respuesta del receptor α 3 β 2 γ 1 de rata y humano cuando se aplican de forma simultánea GABA + β -CCB y GABA + β -CCB + FMZ.. .. | 43 |

XI. Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Receptores o subunidades de proteínas..... | 23 |
|--|----|

XII. Lista de abreviaturas

| | |
|-------------------------------|---|
| GABA_AR | Receptores GABA tipo A |
| GABA | ácido γ -aminobutírico |
| OLs | Oligodendrocitos |
| EC₅₀ | Concentracion media efectiva |
| HEK293 Kidney) | Células de riñón humano embrionario (Human Embryonic |
| β-CCB | Butil- β -carbolina-3-carboxilato |
| FMZ | Flumazenil |
| BZDs | Benzodiacepinas |
| Zn²⁺ | Zinc |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| CNPasa | 2', 3'-nucleótido cíclico-3'-fosfohidrolasa |
| MBP | proteína básica de la mielina |
| PLP | proteína proteolipídica |
| OPC | Célula Precursora de Oligodendrocito |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| AMPA | ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico |
| GABA_B | Receptores GABA tipo B |
| AC | Adenilato Ciclasa |
| PC | Fosfatidilcolina |
| SM | Esfingomielina |
| PE | Fosfatidiletanolamina |
| PS | Fosfatidilserina |
| dNTP | Deoxinucleósido trifosfato |
| DMEN | Medio basal Medium Eagle |
| GFP | Plásmido con el gen de la Proteína verde fluorescente |
| DR | Dosis-Respuesta |
| DZP | Diazepam |