3.1.4 Distibución del Receptor ρ1 en Tejido Cerebral Bovino.

Por medio de RT-PCR se demostró que tanto ρ1 como ρ1 51 se expresan en varias áreas del sistema nervioso central bovino. Utilizando oligonucleótidos específicos que permiten reconocer los productos amplificados de ambas isoformas se demostró que ρ1 y ρ1Δ51 se expresan en retina y cerebelo. Además, ρ1 fué hallado en hipocampo, corteza y nervio óptico. Ninguno de los dos transcritos estuvieron presentes en el cuerpo calloso o en la amígdala (Fig. 14). En ninguna de las muestras analizadas se detectó la subunidad ρ1Δ450.

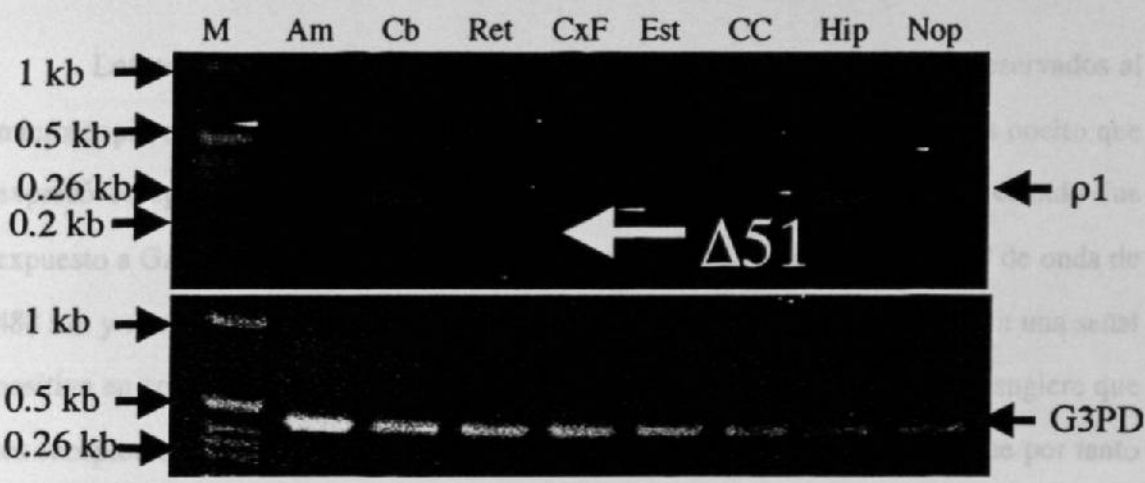

Figura 14. Análisis electroforético de los productos de RT-PCR de ρ1 y ρ1Δ51 obtenidos de diversas áreas del cerebro. Utilizando oligonucleótidos específicos en reacciones de RT-PCR, se lograron distinguir dos de las isoformas de ρ1 (ρ1 y ρ151) en varias áreas del sistema nervioso central bovino: M: marcador de peso molecular, Am: amígdala, Cb:cerebelo, Ret: retina, CxF: corteza frontal, Est: estriado, CC: cuerpo calloso, Hip: hipocampo, Nop: nervio óptico. G3PD: gliceraldehído 3 fosfato desihidrogenasa, que fue usada como control interno de la reacción de RT-PCR.

3.1.5 Expresión de Receptores ρ1 en Fusión con GFP

La inyección del plásmido de expresión portando el gen quimérico ρ1-GFP indujo la formación de receptores funcionalmente idénticos al receptor silvestre. Por ejemplo, los receptores ρ1-GFP responden a bajas concentraciones de GABA, tienen una baja tasa de desensibilización, son insensibles a bicuculina y son antangonizados por TPMPA, el antagonista específico de receptores $GABA_C$, (Fig. 15). Además, también se determinó que la selectividad del canal del receptor quimérico por el ión cloro es igual a la del silvestre.

Los oocitos que expresaron receptores ρ1-GFP funcionales fueron observados al microscopio confocal de fluorescencia (Fig. 15). En esta figura se muestra un oocito que expresó receptores ρ1-GFP y que generó respuestas no desensibilzantes cuando fue expuesto a GABA Fig. 15 A,B). Estos oocitos, al ser excitados a una longitud de onda de 488 nm y al ser observados al microscopio confocal de fluorescencia, muestran una señal positiva en color verde fluorescente a lo largo de la perifieria del oocito. Esto sugiere que los receptores quiméricos conservan todas sus características funcionales y que por tanto los receptores fluorescentes se encuentran muy posiblemente adecuadamente integrados en la membrana plasmática del oocito. Para tener pruebas más contundentes de que los receptores ρ1-GFP se encuentran en la membrana plasmática del oocito, se necesitarían anticuerpos específicos que detecten la proteína *in situ*. Sin embargo, como lo único que se inyectó fue la fusión ρ1-GFP, los receptores funcionales necesariamente deben ser producto de esta fusión, a menos que de alguna manera se pierda GFP, lo cual no es muy probable.

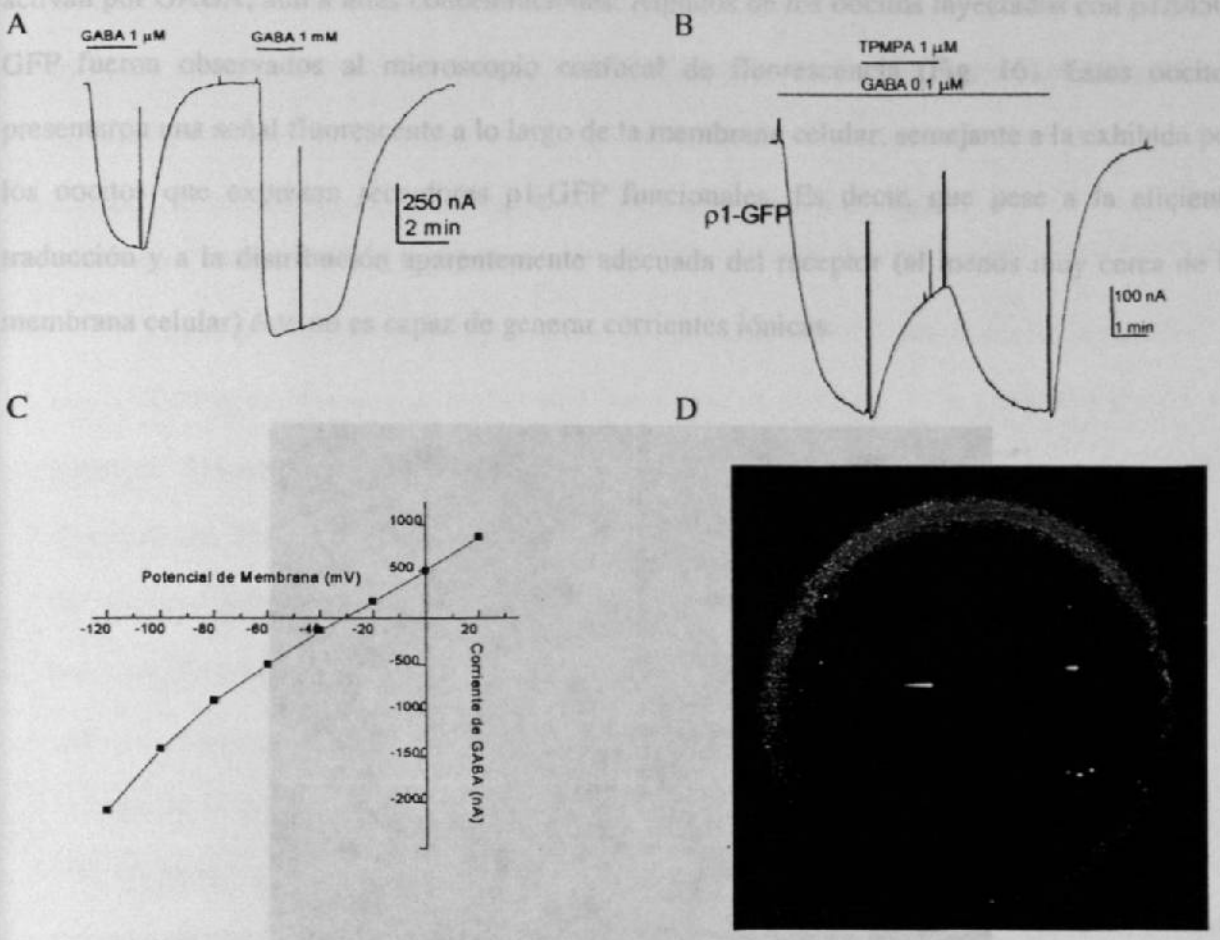

Figura 15. Caracterización funcional del receptor ρ1-GFP. A) ρ1-GFP expresa receptores funcionales que responden a GABA y no desensibilizan. **B)** las corrientes de ρ1-GFP son bloqueadas por TPMPA, que es un antagonista específico de receptores $GABA_C$. **C)** La relación corriente/voltaje reveló que el potencial de equlibrio de este receptor ocurre alrededor de -30 mV, el cual corresponde al potencial de equilibrio del ión cloro y que es semejante al encontrado en los receptores ρ1 silvestres. **D)** Imágen al microscopio confocal de fluorescencia de un oocito expresando receptores funcionales y que muestra fluorescencia principalmente a lo largo de la periferia del oocito.

Sin embargo, ρ1Δ450-GFP, al igual que ρ1Δ450 silvestre, no formó receptores que se activan por GABA, aún a altas concentraciones. Algunos de los oocitos inyectados con ρ1Δ450-GFP fueron observados al microscopio confocal de fluorescencia (Fig. 16). Estos oocitos presentaron una señal fluorescente a lo largo de la membrana celular, semejante a la exhibida por los oocitos que expresan receptores ρ1-GFP funcionales. Es decir, que pese a la eficiente traducción y a la distribución aparentemente adecuada del receptor (al menos muy cerca de la membrana celular) éste no es capaz de generar corrientes iónicas.

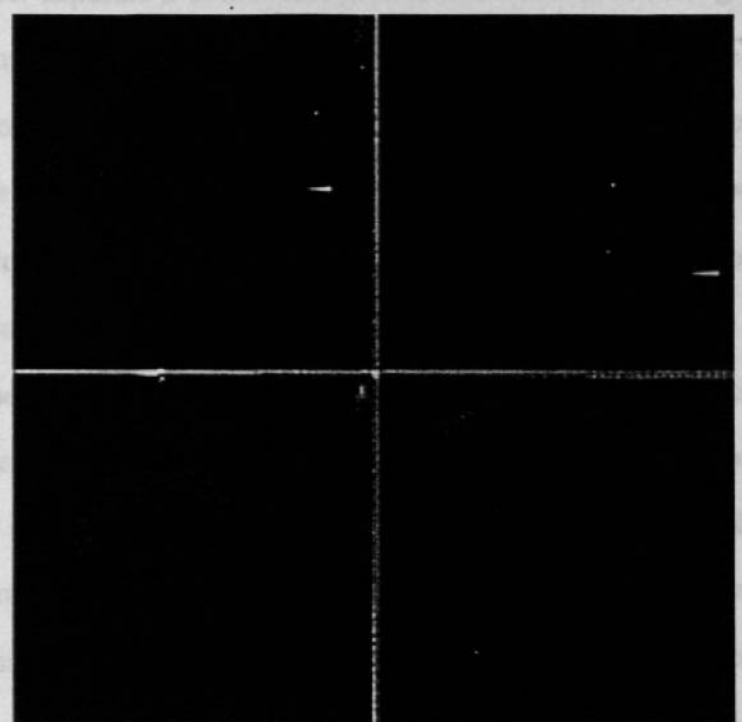

Figura 16. Expresión del receptor ρ1Δ450-GFP. Los oocitos inyectados con el DNAc de la quimera ρ1Δ450-GFP no respondieron a GABA. Estos mismos oocitos fueron vistos al microscopio confocal de fluorescencia y, como muestra la imágen en esta figura, la quimera se traduce eficientemente y su producto se distribuye cerca de la periferia del oocito. La figura muestra un solo oocito visto en cuatro diferentes planos para observar la distribución de la fluorescencia a lo largo de la superficie del oocito.

Asi, si se compara la distribucion de la fluorescencia emitida por los oocitos inyectados con ρ1-GFP con aquella emitida por los oocitos inyectados con ρ1Δ450-GFP se puede observar que no exite en apariencia diferencias en la distribucion del receptor. En ambos casos la fluorescencia está concentrada hacia el hemisferio animal del oocito con muy baja o nula fluorescencia presente hacia el hemisferio vegetal.

Como se muestra en la figura 15 las respuestas generadas por el oocito inyectado con ρ1-GFP al ser expuesto a GABA son prácticamente similares a las generadas por ρ1 silvestre. Sin embargo, algunas difenecias fueron encontradas después de varios ensayos de expresión. Por una parte, la proporción de oocitos expresando receptores funcionales fue siempre inferior al número de oocitos expresando ρ1. Se obtuvieron generalmente entre un 30 y un 50% de oocitos expresando propiamente ρ1-GFP, y todos los oocitos que generaron corrientes de más de 500 nA (con 1μM GABA) mostraron fluorescencia a lo largo de la membrana plasmática. En los oocitos que generaron corrientes inferiores a 500 nA no se les logró detectar fluorescencia ni aún en el hemisferio animal, donde es más abundante. La segunda diferencia radicó en el tiempo de aparición de las respuestas a GABA. Generalmente los oocitos inyectados con ρ1 generaron corrientes robustas a las 48 después de haber sido inyectados en el núcleo con el plásmido de expresión. ρ1-GFP generó corrientes hasta 72 h post-inyección, esto es, tardó al menos un día mas en producir el suficiente número de receptores para generar corrientes lo suficientemente grandes para ser caracterizadas.

Finalmente, la proporción de oocitos expresando ρ1Δ450-GFP fue entre el 50 y 60%. Todos los oocitos que fueron observados al microscopio fueron ensayados electrofisiológicamente y no se logró determinar corrientes a GABA ni a otros agonistas como la glicina y la β-alanina.

3.2 LOS RECEPTORES $GABA_C$ SE EXPRESAN EN EL SNC Y FORMAN HOMO-OLIGOMEROS FUNCIONALES AL EXPRESARSE EN OOCITOS DE *Xenopus*.

3.2.1 Expresión Funcional de Receptores del SNC en Oocitos y Ensayos de PCR.

El RNAm aislado de varias áreas del sistema nervioso central de rata y bovino inyectado en oocitos de *Xenopus* produjo receptores funcionales que respondieron a GABA. Estos receptores mostraron una fase de desensibilización rápida y fueron bloqueados por el alcaloide bicuculina, estas características corresponden a un receptor del tipo $GABA_A$. Los registros electrofisiológicos mostrados en la figura 17 muestran dos ejemplos en los que se puede ver claramente que las respuestas a GABA son robustas y que el potencial de expresión del RNAm es suficiente para observar corrientes generadas por diferentes clases de receptores. Al mismo tiempo, se puede apreciar que las corrientes no son bloqueadas totalmente por bicuculina, lo que sugiere que los receptores $GABA_C$ se encuentren en estos tejidos, pero a niveles de expresión considerablemente bajos.

Además de los registros mostrados en la figura 17 también se obtuvieron respuestas a GABA en los oocitos inyectados con RNAm de hipocampo y nervio óptico aislado de bovinos y de corteza cerebral e hipocampo de rata. Ambas respuestas fueron generadas por recepotres tipo $GABA_A$, sin embargo la magnitud de éstas fue bastante pequeña. No se obtuvieron respuestas a GABA en los oocitos inyectados con RNAm de cuerpo calloso o amigdala (bovino) ni de estriado (rata).

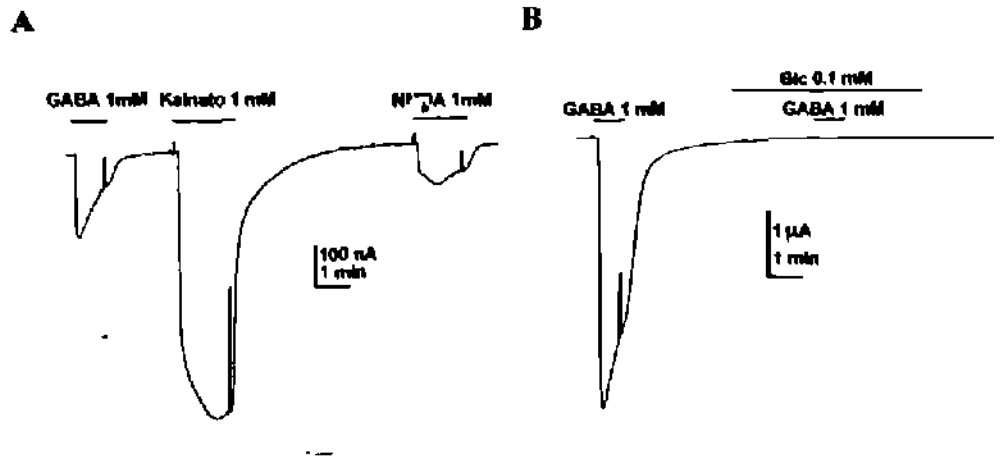

Figura 17. Expresión funcional de RNA poliA$^+$ de cerebelo y corteza. A) Corrientes generadas por un oocito inyectado con RNA poliA$^+$ de corteza cerebral al ser expuesto a los neurotransmisores GABA, kainato y NMDA, donde se observan respuestas robustas para cada uno de ellos. **B)** Respuestas generadas por GABA en un oocito inyectado con RNA poliA$^+$ de cerebelo. Las respuestas en ambos casos corresponden a un receptor tipo $GABA_A$, sin embargo, debido a que aún en la presencia de bicuculina se registran corrientes pequeñas, se sospechó de la presencia de receptores $GABA_C$, aunque en muy bajas cantidades.

Efectivamente, utilizando RT-PCR (lo cual incrementó la resolución de detección pero no permitió el análisis funcional) se lograron detectar receptores del tipo $GABA_C$. Los fragmentos generados por PCR se clonaron en vectores plasmídicos y la figura 18C muestra algunos de los plásmidos analizados. A diez de las clonas positivas se les determinó su secuencia nucleotídica, las cuales permitieron ver que en el cerebelo se expresan ρ1 (3 positivas), ρ2 (6) y ρ3 (1).

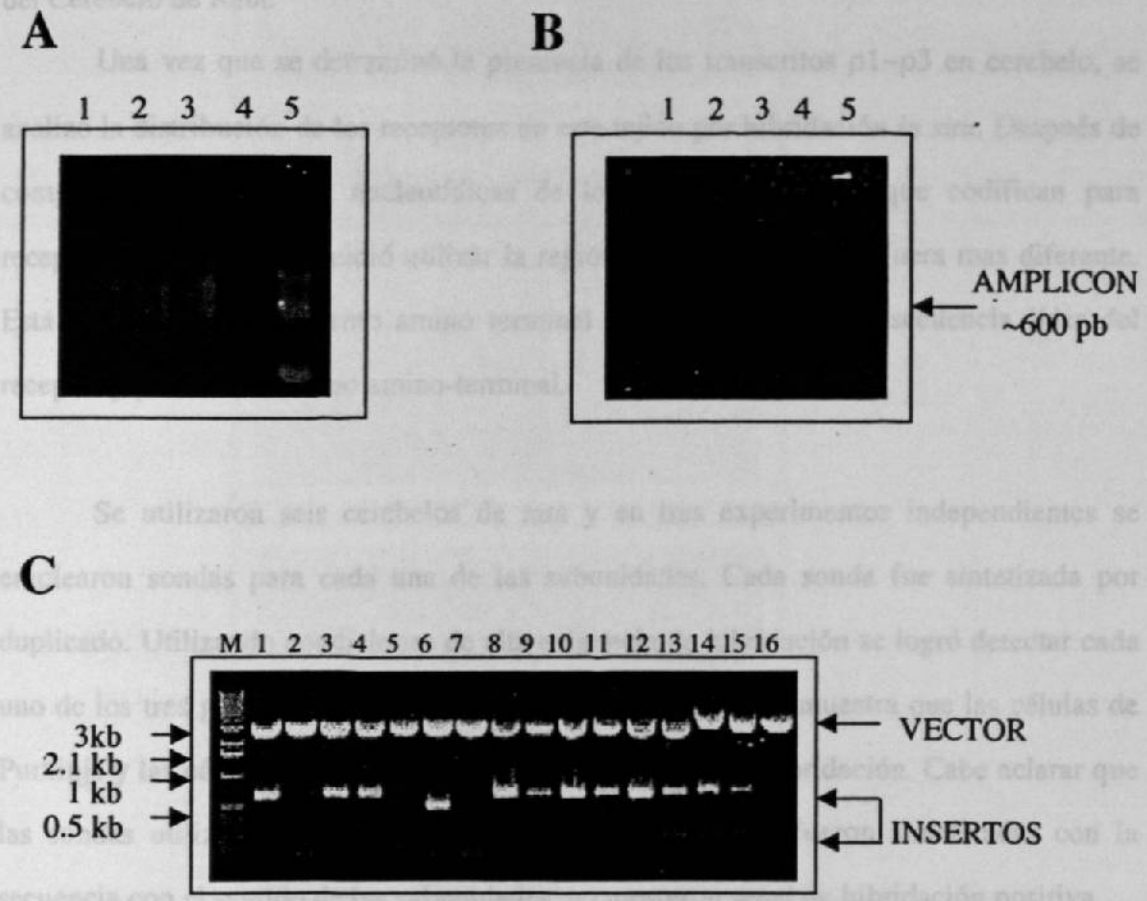

Figura 18. Tamizaje de genes similares a $GABA_C$. A) Gel de agarosa mostrando el RNA total aislado de 1: retina, 2: corteza cerebral, 3: hipocampo, 4: estriado, 5: cerebelo. **B)** Productos de RT-PCR de aproximadamente 600 pb, obtenidos a partir de los RNAs mostrados en el panel A. Se puede observar que la señal en retina es más fuerte que en cualquiera de las otras áreas cerebrales. **C)** Los DNAcs sintetizados a partir de cerebelo, fueron ligados al vector pGEM-T y en esta fotografía se muestra el análisis electroforético de 16 clonas (derivadas a partir de la ligación) después de ser cortadas con *Eco*R1, con M se indica el carril corresponiente al marcador de peso molecular.

3.2.2 Los Receptores $GABA_C$ se Expresan en las Células de Purkinje y de Golgi del Cerebelo de Rata.

Una vez que se determinó la presencia de los transcritos ρ1–ρ3 en cerebelo, se analizó la distribución de los receptores en este tejido por hibridación *in situ*. Después de comparar las secuencias nucleotídicas de los DNAcs clonados que codifican para receptores $GABA_C$, se decidió utilizar la región donde la secuencia fuera mas diferente. Esta corresponde al extremo amino terminal que codifica para la secuencia líder del receptor y parte del extremo amino-terminal.

Se utilizaron seis cerebelos de rata y en tres experimentos independientes se emplearon sondas para cada una de las subunidades. Cada sonda fue sintetizada por duplicado. Utilizando condiciones de alta exigencia de hibridación se logró detectar cada uno de los tres genes en la corteza del cerebelo. La figura 19 muestra que las células de Purkinje y las células de Golgi presentan la mayor señal de hibridación. Cabe aclarar que las sondas utilizadas como control, es decir, aquéllas que fueron sintetizadas con la secuencia con el sentido de las subunidades, no mostaron señal de hibridación positiva.

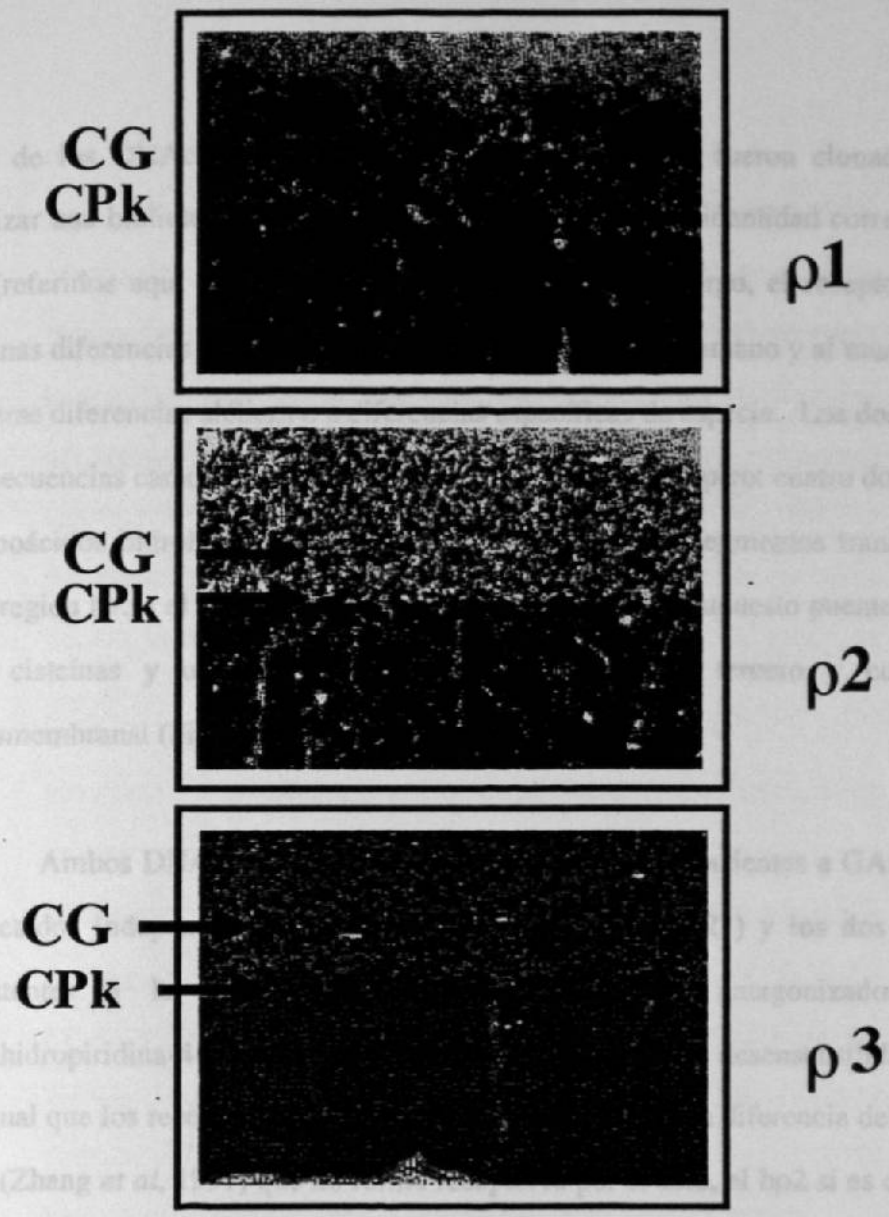

Figura 19. Determinación de la expresión de los receptores ρ1–ρ3 por hibridación *in situ* en cortes de cerebelo de rata. Para determinar la distribución de las subunidades del receptor $GABA_C$ directamente en el tejido, se utilizaron sondas específicas para cada subunidad y la hibridación se llevó a cabo con altas condiciones de astringencia para eliminar cualquier posibilidad de hibridación cruzada. Se puede observar que las señales de hibridación son más fuertes en las células de Purkinje (CPk) y en algunas células de Golgi (CG).

3.2.3 Dos Receptores $GABA_C$ son Expresados en el Cerebelo Bovino

Mediante el uso de oligonucleótidos degenerados en reacciones de PCR, se lograron amplificar segmentos de DNAc con similitud a los receptores ρ1 y ρ2 humanos.

Dos de los DNAcs que codifican para estos receptores fueron clonados después de tamizar una biblioteca de DNAcs de cerebelo bovino y su identidad correspondió a ρ1 y ρ2 (referidos aqui como bρ1 y bρ2) (Fig. 20). Sin embargo, el receptor bρ2 presenta a'gunas diferencias que lo hacen ligeramente diferente al humano y al murino; esto puede deberse diferencias alélicas o a diferencias específicas de especie. Los dos DNAcs tienen las secuencias características básicas de un receptor ionotrópico: cuatro dominios ricos en aminoácidos hidrofóbicos (los cuales forman los cuatro segmentos transmembranales), una región hacia el extremo amino terminal que forma un supuesto puente disulfuro entre dos cisteínas y una asa intracelular grande entre el tercero y cuarto segmento transmembranal (Fig 20).

Ambos DNAcs producen receptores que generan corrientes a GABA cuando son inyectados independientemente en oocitos de rana (Fig. 21) y los dos receptores son resistentes a la bicuculina y son específicamente antagonizados por 1,2,5,6 tetrahidropiridina-4-il-metilfosfinato (TPMPA). La tasa de desensensibilización es baja, al igual que los receptores ρ1 y ρ2 humanos. Sin embargo, a diferencia del receptor ρ2 de rata (Zhang *et al*, 1997) que no forma receptores por sí solo, el bρ2 si es capaz de formar receptores funcionales independientemente de la presencia de cualquier otra subunidad accesoria. Posiblemente, esta capacidad refleja la existencia de la señal de "oligomerización" en el segmento extracelular del receptor, la cual está ausente en el gen de rata y presente en los genes ρ2 de humano y ratón y en ρ1 (Cutting *et al*, 1992, Greka *et al*, 1998, Hackman *et al*, 1997a,b). Por otra parte, ambos receptores son activados eficientemente por β-alanina y glicina. Generalmente las respuestas generadas por bρ1 fueron 10-20 veces mayores que las generadas por bρ2. Este resultado se obtuvo aún con diferentes preparaciones de RNAc e inyectando oocitos provenientes de varias ranas.

ρ1 bovino:

```
1      MRFGIFLLWW GWVLATESRM HWPGREVHEM SKKGRPQRQR REVHEDAHKQ VSPILRRSPD

61     ITKSPLTKSE QLLRIDDHAF SMRPGFGGPA IPVGVDVQVE SLDSISEVDM DFTMTLYLRH

121    YWKDERLSFP STNNLSMTFD GRLVKKIWVP DMFFVHSKRS FIHDTTTDNV MLRVQPDGKV

181    LYSLRVTVTA MCNMDFSRFP LDTQTCSLEI ESYAYTEDDL MLYWKKGNDS LKTDERISLS
                  -----C=C-------
241    QFLIQEFHTT TKLAFYSSTG WYNRLYINFT LRRHIFFFLL QTYFPATLMV MLSWVSFWID
                                                   TM1
301    RRAVPARVPL GITTVLTMST IITGVNASMP RVSYIKAVDI YLWVSFVFVF LSVLEYAAVN
                  TM2                              TM3
361    YLTTVQERKE QKLREKLPCT SGLPPPRTAM LDGNYSDGEV NDLDNYMPEN GEKPDRMMVQ

421    LTLASERSSP QRKSQRSSYV SMRIDTHAID KYSRIIFPAA YILFNLIYWS IFS
                                                   TM4
```

ρ2 bovino:

```
1      MPYFTRLILF LFCLMVLVES RKPKRKRWTG QVEMPKPSHL YKKNLDVTKI RKGKPQQLLR

61     VDEHDFSMRP AFGGPAIPVG VDVQVESLDS ISEVDMDFTM TLYLRHYWKD ERLAFSSASN

121    KSMTFDGRLV KKIWVPDVFF VHSKRSFTHD TTTDNIMLRV FPDGHVLYSM RITVTAMCNM
                                                                     ---
181    DFSHFPLDSQ TCSLELESYA YTDEDLMLHW KNGDESLKTD EKISLSQFLI QKFHTTSRLA
       --C=C--------
241    FYSSTGWYNR LYINFTLRRH IFFFLLQTYF PATLMVMLSW VSFWIDRRAV PARVSLGITT
                              TM1                              TM2
301    VLTMTTIITG VNASMPRVSY VKAVDIYLWV SFVFVFLSVL EYAAVNYLTT VQERKERKLR
                              TM3
361    EKFPCMCGML HSKTMMLDGS YSESEANSLA GYPRSHILTE EERQDKIVVH LGLSGEANAA

421    RKKGLLKGQT GFRIFQNTHA IDKYSRLIFP ASYIFFNLIY WSVFS
                                        TM4
```

Figura 20. Secuencia aminoacídica predicha a partir de la secuencia nucleotídica de los receptores bρ1 y bρ2 clonados de cerebelo bovino. Se muestra la región formada por el puente de cisteínas (C=C) y subrayados los cuatro segmentos hidrofóbicos que forman las regiones transmembranales (TM1-TM4). El DNAc de bρ1 muestra trs cambios aminoacídicos con respecto a la contraparte humana V50, L72, Q335, mientra que bρ2 cambia en dos posiciones I50 G80.

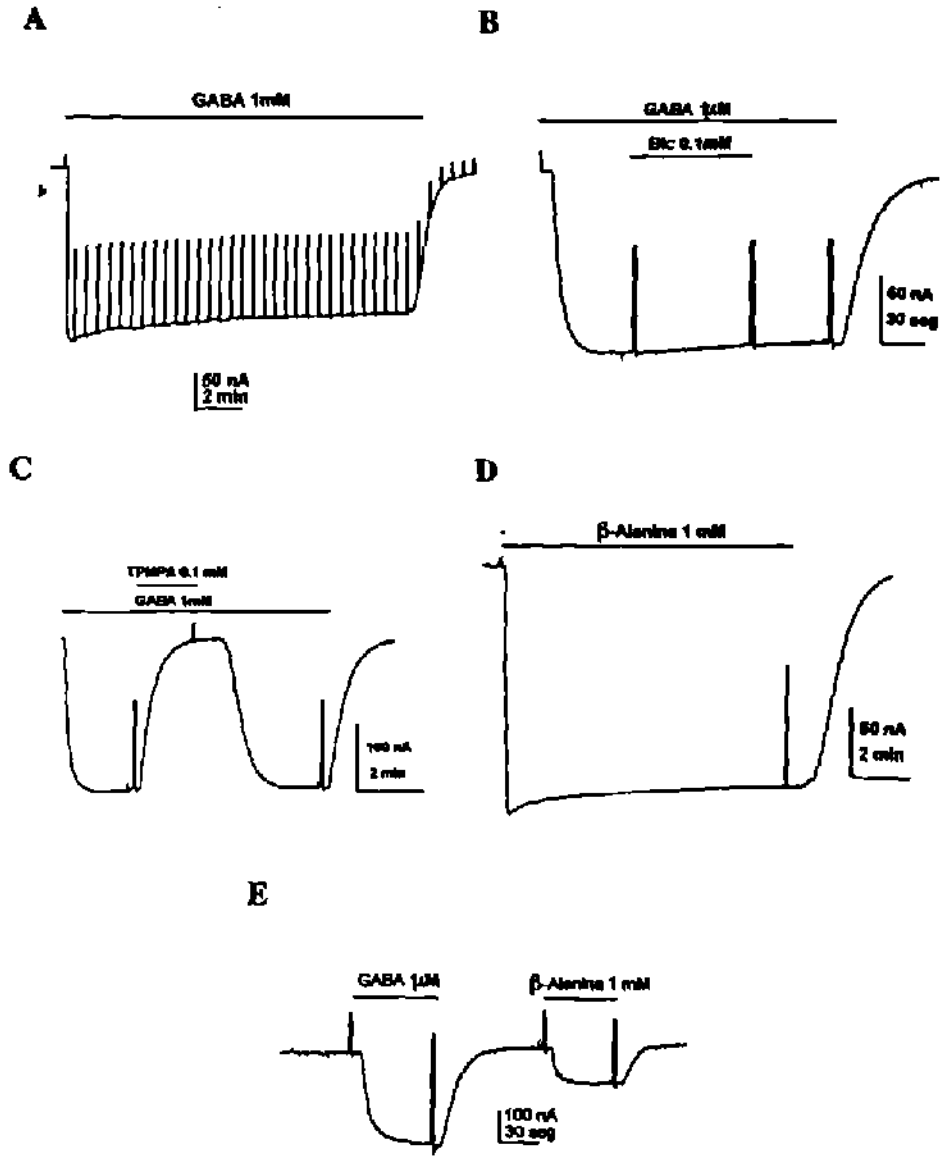

Figura 21. Caracterización funcional de los receptores bρ1 y bρ2 clonados a partir de cerebelo bovino. A) El receptor bρ1 responde a GABA formando corrientes que no desensibilizan, aún después de estar expuesto al agonista por más de diez minutos. **B)** Este receptor es resistente al alcaloide bicuculina (Bic), lo cual es característico de los receptores $GABA_C$. **C)** bρ1 es bloqueado en forma reversible por TPMPA, que es un antagonista específico de receptores $GABA_C$ (Murata et al 1996, Ragozzino et al 1996). **D)** β-alanina también evoca corrientes no desensibilizantes en bρ1 y **E)** El receptor bρ2 responde a GABA y β-alanina, aunque las corrientes generadas son menores a las de bρ1.

3.2.4 Un Receptor Similar a ρ3 se Expresa en Cerebro de Rata Pero no Expresa Receptores Funcionales en Oocitos.

Después de tamizar una biblioteca de DNAc de cerebro de rata se encontraron varias clonas con similitud nucleotídica a receptores $GABA_C$. Una de estas clonas, comparte una alto porcentaje de similitud nucleotídica (>99%) con el receptor ρ3 expresado en retina de rata (Ogurusu *et al*, 1997) (Fig. 22). Sin embargo, el DNAc no forma receptores funcionales al ser inyectado en oocitos de *Xenopus*, aún después de ser expuesto a altas concentraciones de GABA. Este hecho contrasta con el receptor expresado en la retina, el cual produce receptores con las características típicas de los receptores $GABA_C$, cuando es expresado en oocitos (Shingai *et al*, 1996).

```
1     MVLAFWLAFT TYTWITLMLD ASAVKEPHQQ CLSSPKQTRI RETFMRKDDL

61    TKVWPLKREQ LLHIEDHDFS TRPGFGGSPV FVGIDVQVES IDSISEVNMD

121   FTMTFYLRHY WKDERLSFPS TTNKSMTFDR RLIQKIWVPD IFFVHSKRSF

181   IHDTTVENIM LRVHPDGNVL FSLRITVSAM CFMDFSRFPL DTQNCSLELE
                                       -------C=C-------
241   SYAYNEEDLM LYWKHGNKSL NTEEHISLSQ FFIEEFSASS GLAFYSSTGW

301   INFVLRRHIF FFVLQTYFPA MLMVMLSWVS FWIDRRAVPA RVSLGITTVL
                 TM1                                   TM2
361   TMSTIVTGVS ASMPQVSYVK AVDVYMWVSS LFVFLSVIEY AAVNYLTTVE
                                       TM3
421   EWKQLNRRGK ISGMYNIDAV QAMAFDGCYH DGETDVDQTS FFLHSEEDSM

471   RTKFTGSPCA DSSQIKRKSL GGNVGRIILE NNHVIDTYSR IVFPVVYIIF
                                                     TM4
521   NLFYWGIYV
```

Figura 22. Secuencia aminoacídica del receptor rp3. El receptor rp3 fue clonado a partir de una biblioteca de DNAc de cerebro de rata. Aqui se muestra la secuencia aminoacídica predicha a partir del DNAc clonado. El puente de cisteínas en el extremo extracelular amino-terminal (C=C) y los cuatro segmentos transmembranales se muestran subrayados (TM1-TM4).

3.3 LAS MUTACIONES EN LOS SITIOS BLANCO DE FOSFORILACION NO MODIFICAN LA TASA DE DESENSIBILIZACION DE ρ1.

3.3.1 Expresión de Receptores Mutantes en Oocitos *de Xenopus*

El receptor ρ1 modificado en los residuos S425, S434 y S441, generó corrientes robustas cuando se expuso a GABA. Las características de las corrientes macroscópicas del receptor silvestre (tasa de desensibilización de 9.7%) se conservan igual en el receptor mutado (10.1%) después de 1 min de ser expuestos a GABA 10 μM (Fig. 23).

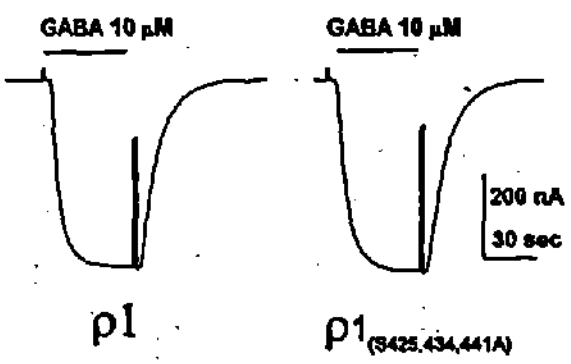

Figura 23. El receptor ρ1 mutado en los aminoácidos blanco para la proteína-cinasa C conserva las propiedades del receptor silvestre. Las respuestas a GABA de los oocitos inyectados con el receptor mutado y el silvestre tienen las mismas características: no desensibilizan y no son antagonizadas por bicuculina.

La inyección de los RNAcs de los receptores AT1 y ρ1 en oocitos induce la expresión de los respectivos receptores funcionales, los cuales inducen amplias corrientes de membrana al ser activados por sus agonistas. La sola presencia de uno ú otro receptor no altera significativamente el nivel de expresión del otro. Sin embargo, cuando el receptor AT1 es activado, se inicia una cadena de eventos que se manifiestan por la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+}, nativos del oocito. La activación de estos mensajeros secundarios condujo a que las respuestas subsecuentes del receptor ρ1 se redujeran alrededor de un 30% (Fig. 24). Esta reducción fue reversible después de varias decenas de minutos, después de lo cual, las corrientes originadas por GABA alcanzaron los niveles obtenidos antes de la activación del receptor AT1.

Al realizar estos mismos experimentos con AT1 y con el receptor mutado $\rho 1_{(S425,434,441A)}$ los resultados fueron semejantes a los obtenidos con el silvestre. Lo cual muestra que los tres residuos tampoco están involucrados en la caída de las respuestas obtenidas después de la activación de los receptores AT1 (Fig. 24).

3.3.2 La Segunda Asa Intracelular de ρ1 no es Fosforilada *in vitro* por PKC o PKG.

Para lograr la expresión de las asas intracelulares de ρ1 y β2 en bacterias, se diseñaron oligonucleótidos que permitieron amplificar esta región por PCR, y a la vez introdujeron secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción que facilitaron su subclonación en la fase de lectura apropiada en el vector de expresión pMALc-2. La figura 25A muestra los ensayos de PCR donde se lograron amplificar las asas intracelulares de las dos subunidades, y la figura 25B muestra dos de los plásmidos recombinantes que portan el fragmento amplificado. La expresión de ρ1 o de β2 en fusión con el gen *mal*C del plámido pMALc2, condujo a la producción de proteínas recombinantes fácilmente distinguibles en geles de poliacrilamida-SDS (Fig. 25C). Las proteínas recombinantes se aislaron por cromatografía de afinidad y luego fueron sujetas a ensayos de fosforilación *in vitro*. Como muestra la figura 26, la asa del receptor β2 presenta una banda positiva que indica la transferencia de grupos fosfato radiomarcados. En el mismo panel se puede observar que ρ1 no es eficientemente fosforilado por PKCα ó por PKG. Estos resultados se repitieron luego variando la temperatura (24 a 37 ^{o}C) y el tiempo de fosforilación (1 hasta 24 h).

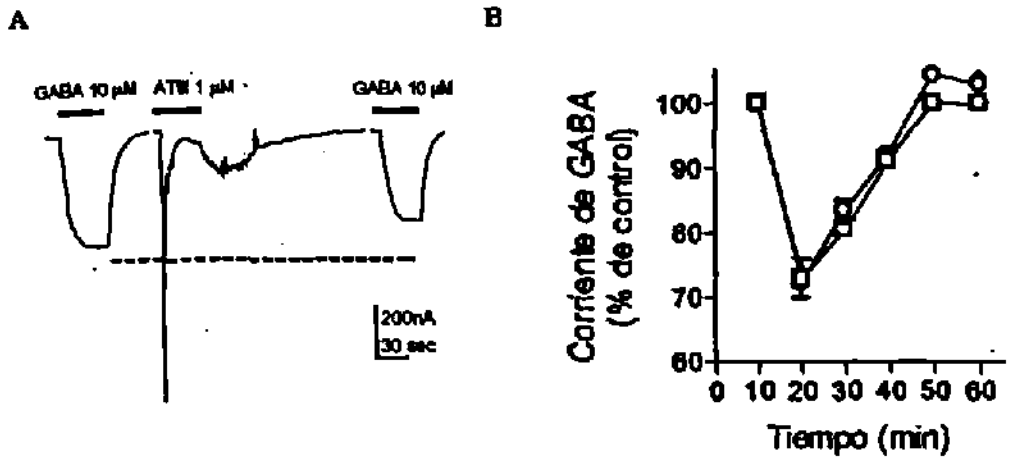

Figura 24. La activación del receptor AT1 inhibe las corrientes generadas tanto por el receptor ρ1 como por $\rho1_{[S425,434,441A]}$ A. Un oocito inyectado con los RNAcs del receptor de Angiotensina (AT1) y de ρ1 genera corrientes mediadas por ambos receptores. Las corrientes mostradas corresponden a una aplicación de GABA (10µM) seguida por una de ATIII (1µM) y diez minutos después, una segunda exposición a GABA (10µM). Se puede observar que después que el receptor AT1 es estimulado, las respuestas subsecuentes del receptor ρ1 disminuyen hasta un 70% del nivel alcanzado previo a la aplicación de ATIII. B. Depués de *ca.* 40 min la magnitud de las corrientes de GABA alcanzan nuevamente los niveles controles. El mismo efecto fue encontrado cuando se expresó el receptor ρ1 mutado en las serinas blanco para proteín-cinasa ($\rho1_{[S425,434,441A]}$). Con el símbolo (O) se indican los niveles de las respuestas de ρ1 y con (□) las originadas por el receptor mutado. Los registros electrofisológicos mostrados muestran las corrientes generadas por GABA antes y después de la activación del receptor AT1. Las corrientes generadas por AT1 se distinguen por ser de carácter oscilatorio debido a la apertura de canales de cloro dependientes de calcio.

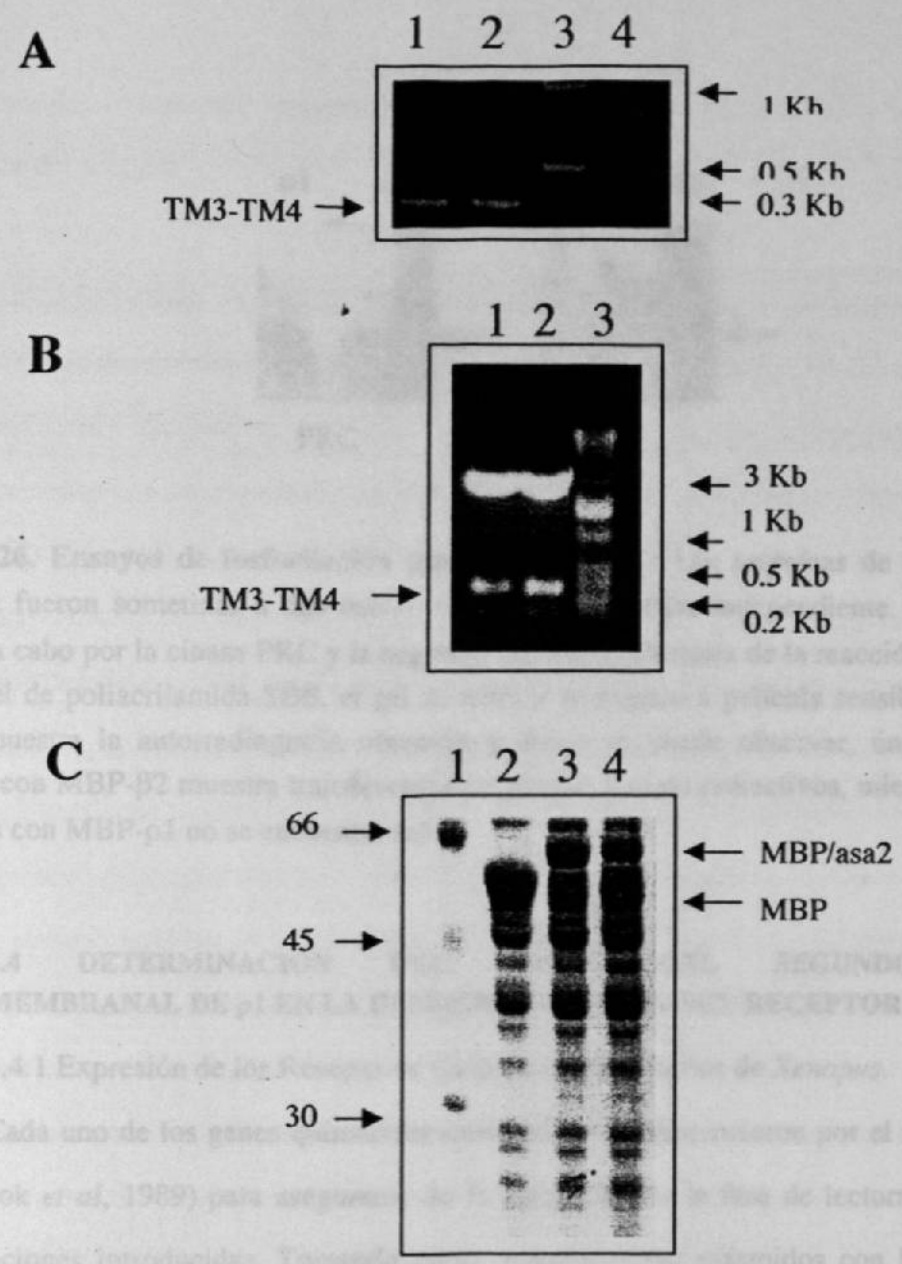

Figura 25. Construcción de plásmidos de expresión e inducción de la expresión en *E. coli*. **A)** Productos de PCR que correspondientes a la amplificación de la región de la segunda asa intracelular de ρ1 (carril 1) y β2 (carril 2). El carril 3 muestra el marcador de peso molecular y el 4 un control negativo de amplificación. **B)** Dos plásmidos cortados con *Bam*H1 y *Pst*1 portando 1: asa de ρ1 y 2) asa de β2. **C)** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de extractos totales de *E. coli* que fueron inducidas para la expresión de 2: MBP, 3: MBP-ρ1 y 4: MBP-β2. El carril 1 muestra un marcador de peso molecular.

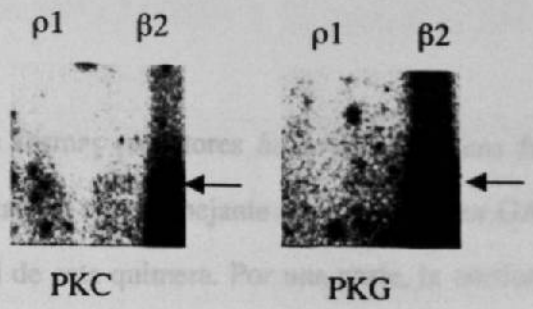

Figura 26. Ensayos de fosforilación por PKC y PKG. Las proteínas de fusión MBP-ρ1 y MBP-β2 fueron sometidas a dos reacciones de fosforilación independiente. Una reacción fue llevada a cabo por la cinasa PKC y la segunda por PKG. Después de la reacción ésta fue resuelta en un gel de poliacrilamida-SDS, el gel se secó y se expuso a película sensible a rayos X. La figura muestra la autorradiografía obtenida y como se puede observar, únicamente el carril cargado con MBP-β2 muestra transferencia de grupos fosfato radiactivos, mientras que aquellos cargados con MBP-ρ1 no se encuentra señal.

3.4 DETERMINACION DEL PAPEL DEL SEGUNDO SEGMENTO TRANSMEMBRANAL DE ρ1 EN LA DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR

3.4.1 Expresión de los Receptores Quiméricos en Oocitos de *Xenopus*.

Cada uno de los genes quiméricos construidos se secuenciaron por el método de Sanger (Sambrook *et al*, 1989) para asegurarse de la integridad de la fase de lectura del gen y de las modificaciones introducidas. Tomando como templados los plásmidos con las construcciones correctas se sintetizó *in vitro* el RNAc quimérico ρ1/α1 (utilizando la RNA polimerasa de T7) y se inyectó en los oocitos. Los niveles de expresión detectados fueron muy bajos. Esto puede deberse a varios factores entre los que se sospechó de la inhabilidad del gen quimérico para formar receptores funcionales *homo-oligoméricos*. Con el fin de incrementar los niveles de producción de receptores funcionales ρ1/α1, el gen quimérico correspondiente se introdujo en el vector de expresión pcDNA3 y esta construcción se inyectó directamente en el núcleo del oocito.

De este modo, se lograron respuestas más robustas, pero aun inferiores, comparadas con las respuestas del receptor ρ1.

ρ1/α1 fue capáz de formar receptores *homo-oligoméricos* funcionales que presentaron una cinética de desensibilización muy semejante a la del receptor $GABA_A$. La figura 27 muestra la caracterización funcional de esta quimera. Por una parte, la corriente membranal inducida por GABA presenta una activación rápida que desensibiliza inmediatamente, seguida de una fase de desensibilización lenta, contrastando dramáticamente con la cinética de los receptores ρ1 y con la del resto de los receptores $GABA_C$. En aplicaciones consecutivas del agonista (GABA 1μM), ρ1/α1 desensibiliza de tal modo que después de la segunda aplicación algunos receptores permanecen inactivos. Las principales características farmacológicas del receptor coinciden casi por completo con las conferidas por la subunidad ρ1 silvestre. Por ejemplo: los receptores ρ1/α1 son bloqueados por iones de Zn^{2+} con la misma potencia y son modulados positivamente por iones de lantano también en la misma forma que los receptores ρ1. Además, TPMPA, que es bloqueador específico de receptores $GABA_C$ (Murata *et al*, 1996; Ragozzino *et al*, 1996) actúa igualmente sobre los receptores ρ1/α1, y éstos, al igual que el resto de los receptores $GABA_C$, son completamente insensibles a bicuculina. La curva de relación corriente/voltaje indicó que ρ1/α1 es permeable a cloro, semejante a lo que sucede en el receptor ρ1 (Woodward *et al*, 1992a,b, 1993a,b).

La quimera $\rho1_{[\alpha1TM2]}$ porta la región TM2 de la subunidad α1 que forma el canal iónico del receptor. Pese a que el receptor $GABA_A$ desensibiliza rápidamente y a que se especula que la tasa de desensibilización es dictada esencialmente por el segundo segmento transmembranal, los resultados obtenidos con esta construcción muestran que los receptores expresados por $\rho1_{[\alpha1TM2]}$ conservan las características farmacológicas típicas de ρ1: bloqueo por Zn^{2+}, modulación por

La^{3+}, insensibilidad a bicuculina y bloqueo por TPMPA (Fig. 28). Contrario a lo esperado, los niveles de desensibilización son semejantes a los receptores formados por la subunidad ρ1 silvestre.

Generalmente, las corrientes generadas al activar $\rho 1_{[\alpha 1TM2]}$ con GABA fueron alrededor de cien veces mas pequeñas que las corrientes generadas por ρ1. Sin embargo, esto no impidió una adecuada caracterización funcional y farmacológica del receptor expresado.

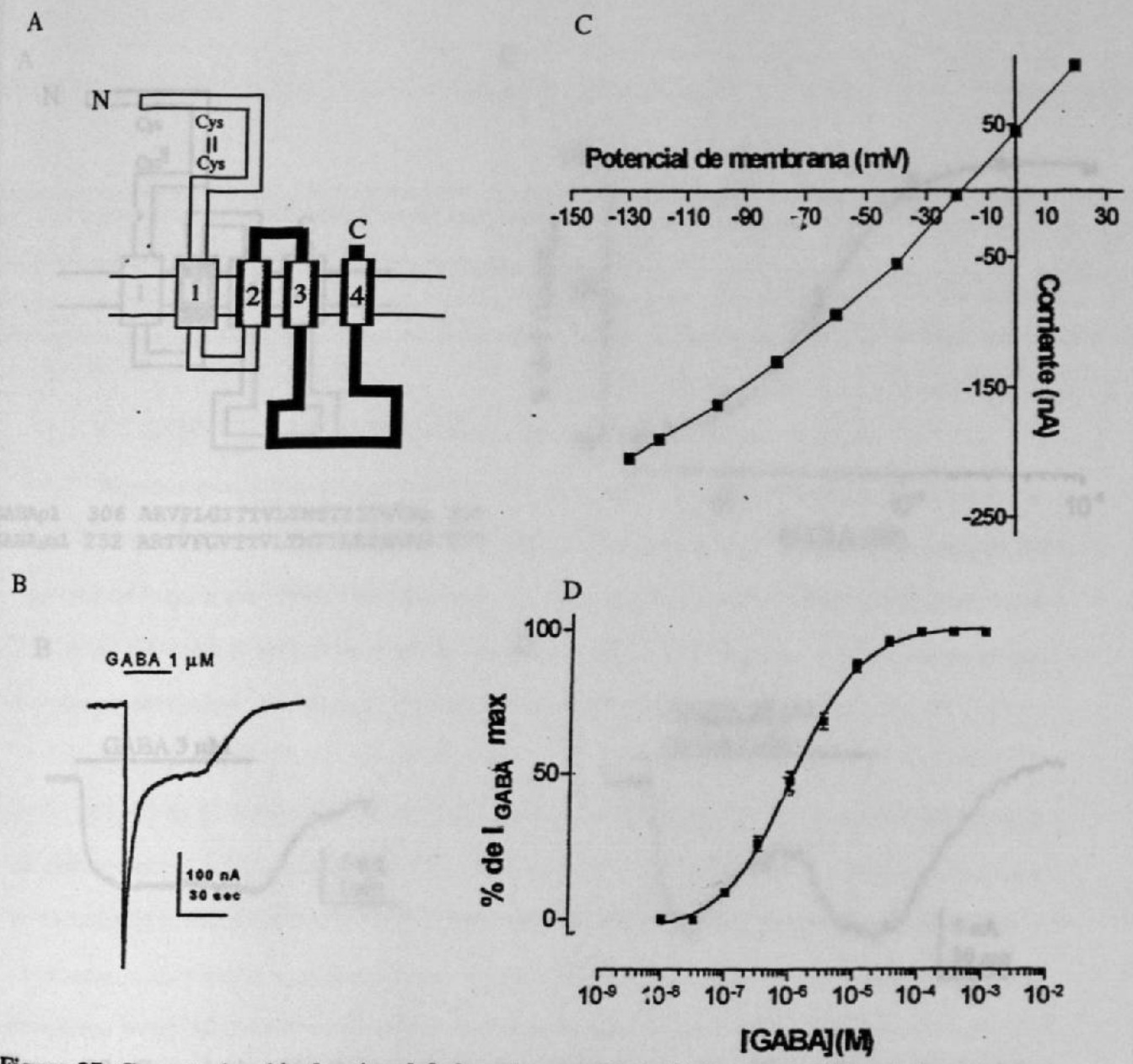

Figura 27. Caracterización funcional de la quimera ρ1/α1. A) Respuesta típica de la quimera ρ1/α1, la cual presenta una fase de desensibilización rápida que contrasta con las corrientes mantenidas de los receptores $GABA_C$. **B)** Relación corriente-voltaje, la cual muestra un potencial de equilibrio de *ca.* -20 mV. Para este experimento se aplicó GABA a 1 µM. **C)** Diagrama de la estructura de ρ1/α1 para mostrar el área compuesta por ρ1 (hasta la primera asa intracelular) y la subunidad α1 (desde el segundo segmento transmembranal hasta el extremo carboxilo). **D)** La relación dosis-respuesta indica que la EC_{50} de la quimera es semejante al receptor silvestre (1.2µM).

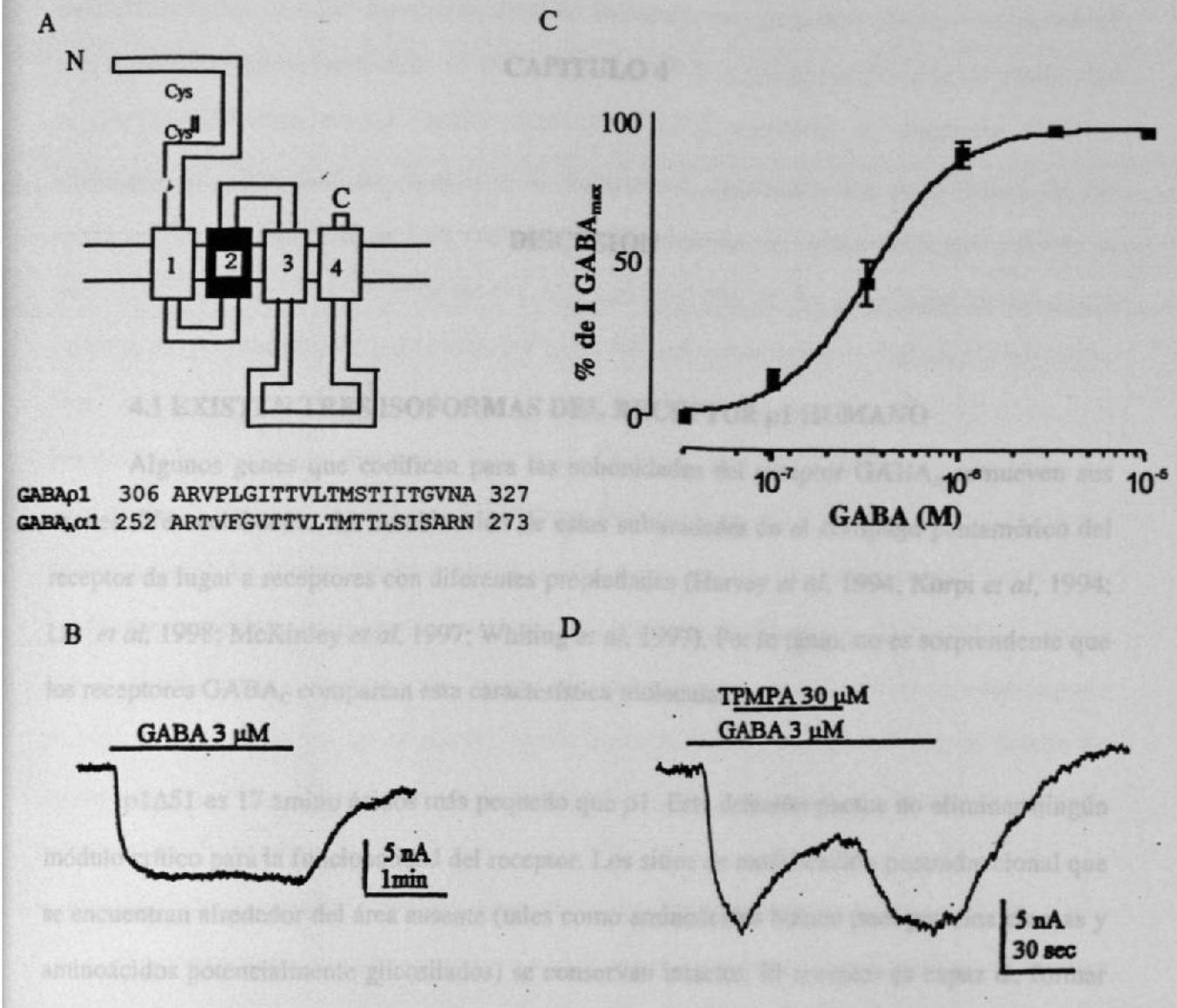

Figura 28. Caracterización funcional de la quimera $\rho1_{[\alpha1TM2]}$. Esta quimera se produjo mediante la sustitución del segundo segmento transmembranal de ρ1 por el correspondiente de la subunidad α1 del receptor $GABA_A$. **A)** Modelo de la estructura de una subunidad de $\rho1_{[\alpha1TM2]}$ ilustrando la posición del segundo segmento transmembranal que es ocupado por la región equivalente de la subunidad α1 del receptor $GABA_A$. Se muestra una comparación entre las secuencias aminoacídicas de las regiones TM2 de ρ1 y α1. **B)** El receptor $\rho1_{[\alpha1TM2]}$ no desensibiliza al ser expuesto a GABA. **C)** La curva dosis/respuesta reveló una EC_{50} de 0.3 μM, que asemeja más a la del receptor ρ1Δ51. **D)** El antagonista específico de receptores $GABA_C$, TPMPA, inhibe las corrientes generadas por GABA.

CAPITULO 4

DISCUSION

4.1 EXISTEN TRES ISOFORMAS DEL RECEPTOR ρ1 HUMANO

Algunos genes que codifican para las subunidades del receptor $GABA_A$ remueven sus exones diferencialmente. La combinación de estas subunidades en el complejo pentamérico del receptor da lugar a receptores con diferentes propiedades (Harvey *et al*, 1994; Korpi *et al*, 1994; Liu *et al*, 1998; McKinley *et al*, 1997; Whiting *et al*, 1997). Por lo tanto, no es sorprendente que los receptores $GABA_C$ compartan esta característica molecular.

ρ1Δ51 es 17 amino ácidos más pequeño que ρ1. Esta deleción parece no eliminar ningún módulo crítico para la funcionalidad del receptor. Los sitios de modificación postraduccional que se encuentran alrededor del área ausente (tales como aminoácidos blanco para proteína cinasas y aminoácidos potencialmente glicosilados) se conservan intactos. El receptor es capaz de formar receptores *homo-oligoméricos* que funcionan como los receptores ρ1.

ρ1Δ450 (la segunda isoforma clonada) presenta una deleción de 450 nt. Este receptor no formó receptores funcionales en oocitos, aún y cuando se emplearon diversos sistemas plasmídicos de expresión (pSP64T y pcDNA3). Los sistemas de expresión empleados se han usado con otros receptores (incluyendo ρ1). Todos ellos permiten la producción de receptores funcionales con un nivel de expresión tal que pueden ser fácilmente estudiados por métodos

electrofisiológicos que son capaces de detectar respuestas muy pequeñas. Aunque su capacidad para formar receptores funcionales no pudo ser comprobada, no se puede descartar la posibilidad de que ρ1Δ450 tenga alguna función moduladora en el complejo de receptores $GABA_C$, inhibiendo la formación de receptores funcionales, o cambiando las propiedades de los receptores en las neuronas que lo expresan. La producción de subunidades que inhiben el ensamblaje apropiado de un receptor no es un evento raro en los receptores $GABA_A$. Por ejemplo, las subunidades α6 y β5 producen isoformas por mecanismos de "splicing" alternativo. Estas isoformas, al co-expresarse con otras subunidades del receptor $GABA_A$ inhiben la formación de un receptor funcional. (Liu *et al*, 1998; Whiting *et al*, 1997). Por otra parte, los esfuerzos para detectar ρ1Δ450 por RT-PCR en diversas áreas del SNC bovino, mostraron que esta subunidad no se expresa en aquellas en las cuales ρ1 y ρ1Δ51 fueron abundantes. Esto puede tener varias explicaciones, entre ellas que los "primers" utilizados en la reacción no fueran los adecuados para distinguir esta subunidad en bovinos o que el evento que da lugar a ρ1Δ450 en retina humana no se efectúe en los bovinos. Para entender con mayor detalle los mecanismos que dan lugar a esta subunidad se deberá hacer un análisis más detallado de la estructura genómica de ρ1.

Otras características conservadas en ρ1Δ51 son: su resistencia a la bicuculina, el bloqueo por iones de zinc, modulación por lantano, activación por β-alanina y glicina y su baja tasa de desensibilización. Hasta ahora solo se ha encontrado una ligera diferencia en las curvas dosis-respuesta, las cuales indican que ρ1Δ51 tiene una EC_{50} menor, es decir, es más sensible a GABA, aun cuando la saturación es semejante para ambos receptores.

El RNAm de ρ1Δ51 se expresa en la retina, en cerebelo y nervio óptico bovino. Al parecer el transcrito es regulado de forma tejido-específica, ya que en otras áreas (hipocampo y

corteza) no se encontró, pese a la presencia de ρ1. Este tipo de regulación del "splicing" se ha encontrado también en la subunidad γ2 del receptor $GABA_A$ (Ashiya *et al*, 1995). En esta subunidad se remueve un exón de 24 nt en el transcrito expresado en la hipófisis, lo que da lugar a una subunidad más pequeña pero aun funcional (γ2S) y la cual, al ser co-expresada con otras subunidades del receptor $GABA_A$, forma receptores con propiedades distintas a aquéllos fornados con la subunidad alterna (γ2L). Este mismo exón no es removido en la subunidad expresada en el cerebelo, médula espinal y tallo, lo que da lugar a la subunidad γ2L, la cual es mas grande y también es funcional (Ashiya *et al*, 1995). Esta regulación tejido-específica plantea un problema muy interesante en los mecanismos moleculares de la expresión génica. Por ejemplo, aún no se conoce cuales son las secuencias nucleotídicas, ni cuales los factores celulares involucrados en la selección entre uno u otro exón de un transcrito primario. Mas aún, otros mecanismos de regulación postranscripcional pueden estar involucrados en procesos patológicos, tales como la esquizofrenia. Por ejemplo, en la corteza prefrontal de cerebros de pacientes esquizofrénicos, la proporción relativa de los transcritos de la subunidad γ2S se encuentra reducida en comparación a los niveles de la subunidad γ2L (Huntsman *et al*, 1998). Este es un tema que deberá ser abordado más a fondo para definir con mayor precisión los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión génica neuronal.

La distribución diferencial de los transcritos alternativos de ρ1 bovino así como sus diferencias funcionales sugieren que esta familia de receptores es más compleja de lo que inicialmente se pensaba y abre nuevas perspectivas en el estudio de la fisiología y regulación postranscripcional de los receptores $GABA_C$.

Como se mencionó anteriormente, los oocitos inyectados con ρ1Δ450 no generaron corrientes iónicas detectables, aún cuando fueron expuestos a altas concentraciones de GABA y

a distintos potenciales de membrana (para tratar de incrementar alguna corriente generada por GABA). Las proteínas en fusión ρ1-GFP y ρ1Δ450-GFP permitieron aclarar varias preguntas. Primero, se demostró que el gen que codifica para ρ1Δ450 es capaz de ser traducido a proteína, como lo indica la potente señal fluorescente encontrada en los oocitos inyectados con el gen artificial ρ1Δ450-GFP. Segundo, el receptor aparentemente es translocado a la membrana plasmática, aunque se necesitarán mayores estudios para determinar con mayor precisión la posición del receptor. Tercero, los receptores quiméricos permitieron ver que ρ1 es lo suficientemente flexible para integrar una proteína completa en su extremo carboxilo (GFP, 27 KD), y que la presencia de esta proteína no altera las corrientes macroscópicas ni la farmacología básica del receptor.

4.2 Los Receptores $GABA_C$ se Expresan en el Sistema Nervioso Central

Se utilizaron varias estrategias para demostrar que los receptores $GABA_C$ no solamente se expresan en la retina, donde se descubrieron originalmente (Polenzani *et al*, 1991), sino que se encuentran también, aun cuando a bajos niveles, en varias áreas del cerebro.

La primera serie de experimentos se diseñó para explorar la posible expresión directa de receptores funcionales en oocitos de *Xenopus* inyectados con RNAm extraído de varias áreas del SNC. Aunque el sistema es bastante sensible (como se ha demostrado con la expresión de múltiples canales iónicos y receptores del SNC) (Gundersen *et al*, 1982a,b, 1983 a,b), en los experimentos mostrados aquí no se logró establecer de manera incontrovertible la presencia de receptores $GABA_C$. Esto es debido posiblemente a los bajos niveles de transcritos que codifican para estos receptores. Sin embargo, como lo muestran los registros electrofisiológicos de la figura 15, el potencial codificante de los RNAm inyectados en los oocitos, es suficiente para observar corrientes generadas por varios neuroreceptores, incluyendo $GABA_A$. En presencia de

altas concentraciones de bicuculina, se registraron peqeñas corrientes inducidas por GABA. Muy posiblemente estas corrientes fueron generadas por receptores $GABA_C$, pero el hecho de que las corrientes eran tan pequeñas impidió un análisis más detallado.

Utilizando oligonucleótidos degenerados en reacciones de RT-PCR, se encontraron amplicones que codifican para receptores $GABA_C$ en cerebelo e hipocampo. No se encontraron transcritos para receptores $GABA_C$ en la amígdala o en el cuerpo calloso. Aunque la técnica de PCR es más sensible para detectar transcritos que son poco abundantes, ésta no permite el análisis funcional del receptor, ya que se amplifica solamente una parte del DNAc que no contiene toda la información para la expresión de un receptor funcional. Algunos de los amplicones obtenidos por PCR se secuenciaron y se encontraron los tres receptores $GABA_C$ (ρ1, ρ2y ρ3). Por primera vez estos resultados resolvieron a favor la noción de la posible expresión de receptores $GABA_C$ en el cerebelo.

Una vez que se obtuvo evidencia sólida de la expresión de receptores $GABA_C$ en varias áreas del SNC, se clonaron los DNAcs que los codifican a partir de genotecas de cerebelo bovino. Los resultados arrojados por el tamizaje permitieron comprobar que la presencia de $GABA_C$ fuera de la retina, no es un evento exclusivo de especie, ya que nuestros resultados muestran que tanto en rata como en bovinos estos receptores son expresados en varias áreas cerebrales, especialmente en el cerebelo. Cuando los DNAcs clonados a partir de cerebelo se inyectaron en oocitos, éstos formaron receptores funcionales que respondieron a GABA. Las características electrofisiológicas y farmacológicas de bρ1 y bρ2 coinciden con las del resto de los receptores $GABA_C$ previamente estudiados: bajos niveles de desensibilización y resistencia a la bicuculina (Polenzani *et al*, 1991, Cutting *et al*, 1991, 1992). Será interesante abordar en el futuro la posibilidad de que bρ1 y bρ2 se ensamblen para formar receptores constituídos por

ambas subunidades y de que estos receptores exhiban propiedades diferentes a aquellas formadas por receptores *homo-oligoméricos*.

Los resultados obtenidos por RT-PCR sugieren que los receptores $GABA_C$ se expresan fuera de la retina y se encuentran con mayor abundancia en el cerebelo. Con el fin de determinar en que áreas y en que tipos celulares se encuentran los transcritos para cada una de las subunidades se realizaron ensayos de hibridación *in situ*. De esta manera se determinó que ρ1, ρ2y ρ3 se encuentran en las células de Purkinje y de Golgi. La presencia de receptores $GABA_C$ en los circuitos neuronales del cerebelo presenta un problema interesante relativo al flujo de la información interneuronal en este órgano.

Una vez realizado este trabajo se reportó que la subunidad ρ2 se expresa en varias áreas del cerebro humano (Enz y Cutting, 1999), mientras que la expresión de la subunidad ρ1 está restringida a la retina. Esto contrasta con los hallazgos aqui reportados, ya que tanto por RT-PCR como por hibridación *in situ* se encontraron señales positivas de expresión, especialmente en el cerebelo. Más aún, la clonación de DNAcs que codifican para subunidades ρ a partir de bibliotecas de cerebelo bovino y corteza de rata, refuerza las evidencias encontradas incialmente. Es posible que la restricción de la expresión de ρ1 en el cerebro humano sea un evento propio de nuestra especie.

La subunidad ρ3 de retina de rata inyectada en oocitos de rana expresa receptores que generan corrientes no desensibilizantes y resistentes a bicuculina (Ogorusu *et al*, 1997). El DNAc similar a ρ3, que fué obtenido de una biblioteca de DNAc de cerebro de rata, presenta algunos cambios en su secuencia nucleotídica que se traducen en cuatro sustituciones aminoacídicas en la región del amino-terminal del receptor. Sin embargo, estos cambios no son

drásticos pues los aminoácidos sustituidos tienen grupos funcionales similares. No obstante, el DNAc de ρ3 de cerebro no formó receptores funcionales, como se demostró mediante el uso de tres sistemas de expresión ya descritos anteriormente. En base a estos resultados, se puede especular que las sustituciones aminoacídicas encontradas son la causa de la falta de formación de receptores funcionales. También se puede prestar a discusión el que esta subunidad sea específica del cerebro y que tal vez necesita la cooperación de subunidades auxiliares, como es el caso del receptor ρ2 de rata (Zhong *et al*, 1997). Para abordar estas especulaciones serán necesarios más experimentos de expresión donde se combinen diferentes subunidades de ρ y también será necesario tener un conocimiento más preciso de la estructura genómica de ρ3, así como del resto de los genes que codifican para las subunidades del receptor.

4.3 CAMBIOS EN LOS SITIOS DE FOSFORILACION EN LOS SITIOS DE FOSFORILACION DEL RECEPTOR ρ1 NO AFECTAN SU TASA DE DESENSIBILIZACION

La evidencia experimental y el análisis de la secuencia aminoacídica del receptor ρ1 hacen suponer que es modificado por mecanismos de fosforilación. Algunos antecedentes han propuesto que ésteres de forbol reducen la magnitud de las respuestas del receptor ρ1 cuando es expresado en oocitos de *Xenopus* (Kusama *et al*, 1995). También existe evidencia de que el receptor $GABA_A$ es eficientemente fosforilado por PKC *in vitro* y en células que expresan el receptor recombinante (Leidenheimer *et al*, 1992; Lin *et al*, 1996) y de que algunas de las secuencias blanco para esta enzima se conservan en ρ1.

Los resultados de experimentos realizados en oocitos mostraron que las mutaciones en los sitios blanco de fosforilación para proteín-cinasas no inducen cambios en las respuestas del receptor ρ1. Por otra parte los resultados obtenidos con los ensayos de fosforilación *in vitro* de

receptores recombinantes, no mostraron evidencia de que el receptor ρ1 sea fosforilado por PKCα o por PKG. Estos resultados no descartan que el receptor sea fosforilado por estas enzimas en alguna otra región del receptor. Tampoco se descarta que los cambios en el receptor mutado no se reflejen en las corrientes macroscópicas obtenidas y que las modificaciones puedan ser detectadas a nivel del comportamiento de la cinética del canal o de otras características del receptor. Para determinar si estos tipos de cambios ocurren en los receptores ρ1 mutados, deberá hacerse un estudio biofísico más detallado que involucre la determinación precisa de la conductancia y tiempo de apertura del canal del receptor silvestre, asi como del mutado.

El efecto que tiene la activación del receptor AT1 sobre ρ1 y $\rho_{1(S425,434,441,A)}$ tiene repercusiones interesantes para la fisiología de ambos receptores. Se especula que la activación de un receptor puede modificar la actividad de un segundo receptor, sin que el agonista del primero actúe directamente sobre el segundo. La cascada de eventos que desencadena la activación de AT1, afecta de manera indirecta la función de ρ1. Este efecto no es llevado a cabo por regulación en los sitios blanco de fosforilación S425, S423 y S441, como lo muestra el resultado de los experimentos de co-expresión con el receptor mutado. Esto no hace a un lado la posibilidad de que el receptor sea modificado por fosforilación en otro dominio o que en la retina (que es el tejido donde se encuentra con más abundacia el receptor ρ1) se exprese una clase especial de proteín-cinasa que modifique específicamente al receptor. Otra opción es que la activación del receptor AT1 promueva la modificación de alguna proteína que funcione como "ancla" a la membrana del receptor ρ1, y que esta proteína sea modificada por la activación de AT1. Recientemente se encontró que la proteína asociada a microtúbulos tipo 1B (MAP1B) funciona como "unión" entre ρ1 y el citoesqueleto en la retina de vertebrados (Hanley *et al*, 1999). Además se sabe que MAP1B es regulada por fosforilación y la presencia de MAP1B desfosforilada es necesaria para la unión con las proteínas del citoequeleto (Pedrotti e Islam

1996; Pedrotti *et al*, 1996). Esta unión podría ser modificada cuando el receptor AT1 es activado, debido a la variedad de cascadas metabólicas que este receptor activa, y es posible que alguna de éstas permita la modulación de la magnitud de la función del receptor a través de la inactivación de la proteína de unión MAP1B. Otra serie de experimentos deberán ser diseñados para responder a estas preguntas.

4.4 EL SEGUNDO SEGMENTO TRANSMEMBRANAL ρ1 NO DETERMINA LA BAJA TASA DE DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR

Algunos estudios indican que el segundo dominio transmembranal de la familia de receptores ionotrópicos está involucrado en la cinética de desensibilización y que algunos residuos de este dominio estan involucrados en esta función (Im *et al*, 1995; Revah *et al*, 1991;, Palma *et al*, 1998). Los resultados presentados aquí demuestran que el segundo segmento transmembranal de ρ1, por si solo, no es responsable de la baja desensibilización del receptor. Esto se deduce de los experimentos en los que el segundo segmento transmembranal de ρ1 es sustituído por el de un receptor de desensibilización rápida (subunidad α1 de $GABA_A$) y esta modificación por si sola, no fué suficiente para alterar la cinética del receptor.

La quimera ρ1/α1 mostró ser de vasta información funcional y farmacológica. Primero, la tasa de desensibilización se vió dramáticamente afectada y (como se concluyó de los experimentos mostrados anteriormente) debido a que TM2 no es el responsable exclusivo de este comportamiento, se puede especular que los dominios localizados entre TM2 y el codón de terminación son los que transfieren este fenotipo. Posiblemente no es solo una región la que determina la tasa de desensibilización y quizás es necesaria la cooperación de otras regiones del receptor. Para redondear estas conclusiones, se requieren más experimentos que involucren el intercambio de diversas regiones del receptor. Segundo, la presencia del segmento extracelular

del receptor ρ1 fué suficiente para que el receptor quimérico conservara la resistencia a bicuculina y para ser bloqueado por TPMPA. Esto permite especular que los sitios localizados en la región extracelular del receptor transfieren estas características a la quimera. Además, también se conservan el bloqueo por iones de Zn^{2+} y la potenciación por La^{3+}, aunque las mismas características son compartidas por los receptores $GABA_A$.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Al iniciar este estudio se conocía muy poco sobre la estructura, función y farmacología de los receptores $GABA_C$. Después de la clonación de varios miembros de esta familia, se ha obtenido información más precisa sobre las características funcionales de las subunidades que forman estos receptores.

Aquí se describen experimentos que condujeron a la clonación de isoformas funcionales del receptor ρ1, originadas por "splicing" alternativo (Marínez-Torres *et al*, 1998). Este mecanismo no es raro en los genes de la familia de receptores $GABA_A$ (Harvey *et al*, 1994; Korpi *et al*, 1994; Liu *et al*, 1998; McKinley *et al*, 1997; Whiting *et al*, 1997), pero en receptores $GABA_C$ marca el primer indicio claro de una diversidad más grande de la esperada. Esta diversidad se vé aumentada por el hecho de que ρ1 es regulado además en un patrón específico de tejido.

También se presentan evidencias de la expresión de receptores $GABA_C$ fuera de la retina. Estos hallazgos se hicieron siguiendo diferentes metodologías: inyección de RNAm a oocitos de rana, RT-PCR, hibridación *in situ* y clonación molecular de dos DNAcs a partir de bancos de DNAc de cerebelo bovino y uno de cerebro de rata. La presencia de estos receptores y de una de

sus formas alternativas en el SNC, formula nuevas preguntas sobre el papel que pueden jugar en la fisiología del cerebro y particularmente del cerebelo de mamíferos.

Como resultado de otra serie de estudios se encontró que el receptor ρ1 no es modificado directamente por proteín-cinasas. A la vez, se demostró que la activación del receptor AT1 inhibe las respuestas del ρ1 mediante un mecanismo que involucra cascadas metabólicas intracelulares. Aunque las vías metabólicas involucradas aún no se han caracterizado con detalle, este estudio hace notar que existen interacciónes entre neurotransmisores y receptores a través de una red de componentes intracelulares que pueden afectar la actividad de los neuroreceptores.

El mecanismo de desensibilización de ρ1 fue abordado mediante la construcción de algunos receptores mutantes y otros receptores quiméricos que se construyeron *in vitro*. Estos estudios descartaron que las serinas que son blancos potenciales de fosforilación y que están localizadas en la segunda asa intracelular de ρ1, jueguen un papel crítico en la baja tasa de desensibilización del receptor. Por otra parte, gracias a la expresión de las quimeras ρ1/α1 se "disecaron" algunas regiones funcionales del receptor y se descartó al segundo segmento transmembranal del receptor, como responsable exclusivo de la baja tasa de desensibilización. Además, estos resultados permitieron iniciar la "disección" de posibles sitios farmacológicamente importantes. Por ejemplo, la sola presencia del dominio extracelular confiere a los receptores quimera la resistencia a bicuculina y la especificidad del bloqueo por TPMPA.

Consideraciones Finales y Perspectivas

Los resultados aquí presentados plantean muchas preguntas que deberán ser abordadas utilizando técnicas de biología molecular y estructural y electrofisiología. Por ejemplo, ¿cuáles

son los mecanismos de regulación que permiten la presencia de una forma alternativa del receptor en diferentes áreas del SNC y no en otras?. ¿En que parte están localizados los receptores $GABA_C$ en la corteza cerebral? y ¿cual es la función de estos receptores en el cerebelo? Por otra parte, los mecanismos de regulación transcripcional de cada uno de los genes de las subunidades que forman el receptor $GABA_C$ son desconocidos y su estudio tal vez permita encontrar secuencias nucleotídicas y factores transcripcionales que sean exclusivos o enriquecidos en la retina. Sin duda los genes quiméricos construídos permitirán estudiar más a fondo los mecanismos biofísicos involucrados en la cinética de los canales formados por los receptores $GABA_C$. Además, aún se desconoce en detalle la conductancia y tiempo de apertura de los receptores silvestres y sería interesante saber como se modifican estas propiedades cuando se transfieren módulos de otros receptores (como el $GABA_A$). Además, el estudio de la estructura tridimensional de estos receptores es prácticamente inexistente y será de mucha importancia obtener imágenes de cristales formados por este receptor para comprender más detalladamente su función. En particular el estudio de cómo la estructura de un receptor es modificada al momento de la activación e inactivación del mismo y cómo la estructura del canal iónico permite selectivamente la entrada de un solo tipo de ion. Los genes en fusión con la Proteína Verde Fluorescente permitieron observar el comportamiento del receptor expresado en la membrana del oocito y seguramente un estudio detallado ayudará a definir los procesos involucrados en la síntesis, maduración y tráfico intracelular del receptor además de su posible internalización e interacción con otras proteínas. El estudio de la participación de estos receptores en patologías del sistema nervioso también es una línea de investigación prácticamente inexplorada. Finalmente, el papel de los receptores $GABA_C$ en la fisiología de la retina está apenas abordandose sistemmáticamente y seguramente la combinación de métodos electrofisiológicos y farmacológicos, junto con métodos moleculars y tecnología de animales transgénicos permitirán grandes avances en la comprensión del papel funcional de estos receptores.

Referencias

Amin, J. y Weiss, D.S. (1994) Homomeric ρ1 GABA channels: activation properties and domains. *Receptors and Channels*. **2**:227-236.

Ashiya, M. y Grabowski, P.J. (1997) A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA of the rat cerebellum. *RNA*. **2**:1241-1253.

Bailey, M.E., Matthews D.A., Riley B.P., Albrecht B.E., Kostrzewa M., Hicks A.A., Harris R., Muller U., Darlison, M.G. y Johnson K.J. (1999) Genomic mapping and evolution of human $GABA_A$ receptor subunit gene clusters. *Mammalian Genome*. **10**:839-843.

Bamber, B.A., Beg, A.A., Twyman, R.E. y Jorgensen, E.M. (1999) The *Caenorhabditis elegans unc*-49 locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J. Neurosci.* **19**:5348-5359.

Birnir, B., Tierney, M.L., Lim, M., Cox, G.B. y Gage, P.W. (1997) . Nature of the 5' residue in the M2 domain affects function of the human α1β1 $GABA_A$ receptor. *Synapse*. **26**:324-327.

Birnir, B., Tierney, M.L., Dalziel, J.E., Cox, G.B. y Gage, P.W. (1997) A structural determinant of desensitization and allosteric regulation by pentobarbitone of the $GABA_A$ receptor. *J. Membrane Biol.* **155**:157-166.

Boue-Grabot, E., Dufy, B. y Garret, M. (1995) Molecular diversity of GABA-gated chloride channels in the rat anterior pituitary. *Brain Res.* **704**:125-129.

Calvo, D.J., Vazquez, A.E. y Miledi, R. (1994). Cationic modulation of ρ1-type γ-aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:12725-12729.

Calvo, D.J. y Miledi, R. (1995) Activation of GABA ρ1 receptors by glycine and β-alanine. *Neuroreport*, **6**:1118-1120.

Calvo, D. J. y Miledi, R. (1998) Interaction of benzodiazepines with homomeric GABAρ1 receptors from human retina. 28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Part 2, Los Angeles, California, USA, Noviembre. Society for Neuroscience Abstracts. **24**: 2038.

Cash, D.J. y Subbarao, K. (1988) Different effects of pentobarbital on two γ-aminobutyrate receptors from rat brain: channel opening, desensitization, and an additional conformational change. *Biochemistry*. 27:4580-4590.

Celentano, J.J. y Wong, R.K. (1994) Multiphasic desensitization of the $GABA_A$ receptor in outside-out patches. *Biophys. J.* **66**:1039-1050.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. y Prasher DC. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. **263**:802-805.

Chang, Y., Amin, J. y Weiss, D.S. (1995) Zinc is a mixed antagonist of homomeric ρ1 γ-aminobutyric acid-activated channels. *Mol. Pharm.* **47**:595-602.

Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* **162**:156-159.

Connolly, C.N., Krishek, B.J., McDonald, B.J., Smart, T.G. y Moss, SJ. (1996) Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric γ-aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol.Chem.* **271**:89-96.

Costa, E. y Guidotti, A. (1996) Benzodiazepines on trial: a research strategy for their rehabilitation. *Trends Pharm. Sci.* 17:192-200.

Cutting, G.R., Curristin, S., Zoghbi, H., O'Hara, B., Seldin, M.F. y Uhl GR. (1992) Identification of a putative γ-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit ρ2 cDNA and colocalization of the genes encoding ρ2 (GABRR2) and ρ1 (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics*. **12**:801-806.

Cutting, G.R., Lu, L., O'Hara, B.F., Kasch, L.M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D.M., Shimada, S, Antonarakis, S.E., Guggino, W.B. y Uhl, G.R. (1991) Cloning of the γ-aminobutyric acid (GABA) ρ1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:2673-2677.

Dong C.J. y Werblin F.S. (1995) Zinc downmodulates thf $GABA_C$ receptor current in cone horizontal cells acutely isolated from the catfish retina. *J. Neurophys.* 73:916-919.

Dong C.J. y Werblin F.S. (1998) Temporal contrast enhancement via $GABA_C$ feedback at bipolar terminals in the tiger salamander retina. *J. Neurophys.* 79:2171-2180.

Dumont J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* 136:153-179.

Enna, S.J. y Bowery, N.G. (1997) The GABA receptors. 2da Edición. The Human Press. Totowa, New Jesey, EUA. 332pp.

Enz, R. Brandstaetter, J.H., Hartveit, E., Waessle, H. y Bormann, J. (1995). Expression of GABA Receptor ρ1 and ρ2 Subunits in the retina and brain of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1495-1501.

Enz, R. y Bormann, J. (1995) A single point mutation decreases picrotoxinin sensitivity of the human GABA receptor ρ1 subunit. *Neuroreport.* 6:1569-1572.

Enz, R. y Cutting, G.R. (1999) $GABA_C$ receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur. J. Neurosi.* 11:41-50.

Enz, R. y Cutting, G.R.(1998) Molecular composition of $GABA_C$ receptors. *Vis. Res.* 38:1431-1441.

Enz, R., Brandstaetter, J.H., Waessle, H. y Bormann, J. (1996) Immunocytochemical localization of the $GABA_C$ receptor ρ subunits in the mammalian retina. *J. Neurosc.* 16: 4479-4490.

Enz, R., Brandstatter, J.H., Hartveit, E., Wassle, H;. y Bormann, J. (1995) Expression of GABA receptor ρ1 and ρ2 subunits in the retina and brain of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7:1495-1501.

Feigenspan, A. y Bormann, J. (1994) Differential pharmacology of $GABA_A$ and $GABA_C$ receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur. J. Pharm.* 288:97-104.

Feigenspan, A. y Bormann, J. (1994) Modulation of $GABA_C$ receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J. Physio.* **481**:325-30.

Feigenspan, A., Wassle, H., y Bormann, J. (1993) Pharmacology of GABA receptor Cl^- channels in rat retinal bipolar cells. *Nature.* **361**:159-162.

Fletcher, E.L., Koulen, P. y Wassle, H. (1998) $GABA_A$ and $GABA_C$ receptors on mammalian rod bipolar cells. *J. Comp. Neurol.* **396**:351-365.

Fritschy, J.M., Benke D., Johnson, D.K., Mohler, H. y Rudolph, U. (1997) $GABA_A$-receptor α-subunit is an essential prerequisite for receptor formation *in vivo*. *Neurosci.* **81**:1043-1053.

Garcia-Colunga, J. y Miledi R. (1997) Opposite effects of lanthanum on different types of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroreport.* **8**:3293-3296.

Glatt, K., Glatt, H. y Lalande, M. (1997) Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics.* **41**:63-69.

Greger, V., Knoll, J.H., Woolf, E., Glatt, K., Tyndale, R.F., DeLorey, T.M., Olsen, R.W., Tobin, A.J., Sikela, J.M. y Nakatsu, Y. (1995). The γ-aminobutyric acid receptor γ3 subunit gene (GABRG3) is tightly linked to the α5 subunit gene (GABRA5) on human chromosome 15q11-q13 and is transcribed in the same orientation. *Genomics.* **26**:258-264.

Greka, A., Koolen, J.A., Lipton, S.A. y Zhang, D. (1998) Cloning and characterization of mouse $GABA_C$ receptor subunits. *Neuroreport.* **9**:229-232.

Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1983a) Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc.* Series B: Biological Sciences. **219**:103-109.

Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1983b) Voltage-operated channels induced by foreign messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc.* Series B: Biological Sciences. **220**:131-140.

Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1984a) Glutamate and kainate receptors induced by rat brain messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc.* Series B: Biological Sciences, **221**:127-143.

Gundersen, C.B., Miledi R. y Parker, I. (1984b) Messenger RNA from human brain induces drug- and voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. *Nature.* **308**:421-424.

Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1984c) Properties of human brain glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc.* London. **221**:235-244.

Hackam, A.S., Wang, T.L., Guggino, W.B. y Cutting, G.R. (1997) A 100 amino acid region in the GABA ρ1 subunit confers robust homo-oligomeric expression. *Neuroreport.* **8**:1425-1430.

Hackam, A.S., Wang, T.L., Guggino, W.B. y Cutting, G.R. (1997) The N-terminal domain of human GABA receptor ρ1 subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction. *J. Biol. Chem.* **272**:13750-13757.

Hampson, D.R., Theriault, E., Huang, X.P., Kristensen, P., Pickering, D.S., Franck, J.E. y Mulvihill, E.R. (1994) Characterization of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor in the central nervous system of the rat. *Neurosci.* **60**:325-336.

Han, M.H., Li, Y. y Yang, X.L. (1997) Desensitizing $GABA_C$ receptors on carp retinal bipolar cells. *Neuroreport.* **8**:1331-1335.

Hanley, J.G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P.R. y Moss, S.J. (1999) The protein MAP-1B links $GABA_C$ receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature.* **397**:66-69.

Harvey, R.J., Chinchetru, M.A., y Darlison, M.G. (1994) Alternative splicing of a 51-nucleotide exon that encodes a putative protein kinase C phosphorylation site generates two forms of the chicken γ-aminobutyric acidA receptor β2 subunit. *J. Neurochem.* **62**:10-16.

Homanics, G.E., Harrison, N.L., Quinlan, J.J., Krasowski, M.D., Rick, C.E., de Blas, A.L., Mehta, A.K., Kist, F., Mihalek, R.M. y Aul, J.J. (1999) Normal electrophysiological and

behavioral responses to ethanol in mice lacking the long splice variant of the γ2 subunit of the γ-aminobutyrate type A receptor. *Neuropharmacology*. **38**: 253-265.

Hosie, A.M. y Sattelle, D.B. (1996) Agonist pharmacology of two *Drosophila* GABA receptor splice variants. *Br. J. Pharm.* **119**:1577-1585.

Huntsman, M.M., Tran; B.V., Potkin, S.G., Bunney, W.E. Jr. y Jones, E.G. (1998) Altered ratios of alternatively spliced long and short γ2 subunit mRNAs of the γ-amino butyrate type A receptor in prefrontal cortex of schizophrenics. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**:15066-15071.

Im, M.S. Hamilton, B.J., Carter, D.B. y Im W.B. (1992) Selective potentiation of GABA-mediated Cl^- current by lanthanum ion in subtypes of cloned $GABA_A$ receptors. *Neurosci. Lett.* **144**:165-168.

Im, W.B. Binder, J.A., Dillon, G.H., Pregenzer, J.F., Im, H.K. y Altman R.A. (1995) Acceleration of GABA-dependent desensitization by mutating threonine 266 to alanine of the α6 subunit of rat $GABA_A$ receptors. *Neurosci. Lett.* **186**: 203-207.

Imoto, K., Busch, C., Sakmann, B., Mishina, M., Konno, T., Nakai, J., Bujo, H., Mori, Y., Fukuda, K. y Numa, S. (1988) Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature*. 335:645-648.

Isomoto, S., Kaibara, M., Sakurai-Yamashita, Y., Nagayama, Y., Uezono, Y., Yano, K. y Taniyama, K. (1998) Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat $GABA_B$ receptor. *Bioch. Biophys. Res.Comm.* **253**:10-15.

Johnston, G.A. (1996) $GABA_C$ receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharm. Sci.* **17**:319-323.

Jones, A., Bahn S., Grant, A.L. Kohler, M. y Wisden, W. (1996) Characterization of a cerebellar granule cell-specific gene encoding the γ-aminobutyric acid type A receptor α6 subunit. *J. Neurochem.* **67**: 907-916.

Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H. y Froestl, W. (1997) Expression cloning of $GABA_B$ receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*. **386**:239-246.

Kaupmann, K., Schuler, V., Mosbacher, J., Bischoff, S., Bittiger, H., Heid, J., Froestl, W., Leonhard, S., Pfaff, T. y Karschin, A. (1998) Human γ-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K^+ channels. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**: 14991-14996.

Kellenberger, S., Malherbe, P. y Sigel, E. (1992) Function of the α1β2γ2S γ-aminobutyric acid type A receptor is modulated by protein kinase C via multiple phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* **267**:25660-25663.

Korpi, E.R., Kuner, T., Kristo, P., Kohler, M., Herb, A., Luddens, H. y Seeburg, PH. (1994) Small N-terminal deletion by splicing in cerebellar α6 subunit abolishes $GABA_A$ receptor function. *J. Neurochem.* **63**:1167-1170.

Kostrzewa, M., Kohler, A., Eppelt, K., Hellam, L., Fairweather, N.D., Levy, E.R. Monaco, A.P. y Muller, U. (1996) Assignment of genes encoding $GABA_A$ receptor subunits α1, α6, β2, and γ2 to a YAC contig of 5q33. *Eur. J. Hum. Gen.* **4**:199-204.

Koulen, P., Brandstatte,r J.H., Enz, R., Bormann, J. y Wassle, H. (1997) Synaptic clustering of $GABA_C$ receptor ρ-subunits in the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* **10**:115-127.

Koulen, P., Brandstatter, J.H., Kroege,r S., Enz, R., Bormann, J. y Waessle, H. (1997) Immunocytochemical localization of the $GABA_C$ receptor ρ subunits in the cat, goldfish, and chicken retina. *J. Comp. Neuro.* **380**: 520-532.

Krasowski, M.D., Finn, S.E., Ye, Q. y Harrison, N.L. (1998) Trichloroethanol modulation of recombinant $GABA_A$, glycine and GABA ρ1 receptors. *J. Pharm. Exp. Ther.* **284**:934-942.

Krieg, P.A. y Melton, D.A. (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nuc. Acids Res.* 12:7057-7070.

Krishek, B.J., Moss, S.J. y Smart, T.G. (1996) A functional comparison of the antagonists bicuculline and picrotoxin at recombinant $GABA_A$ receptors. *Neuropharmacology*, **35**:1289-1298.

Kusama, T., Sakurai, M., Kizawa, Y., Uhl, G.R. y Murakami, H. (1995) GABA ρ1 receptor: inhibition by protein kinase C activators. *Eur. J. Pharm.* **291**:431-434.

Kusama, T., Spivak, C.E., Whiting, P., Dawson, V.L., Schaeffer, J.C. y Uhl, G.R. (1993) Pharmacology of GABA ρ1 and GABA α/β receptors expressed in *Xenopus* oocytes and COS cells. *Br. J. Pharm.* **109**:200-206.

Kusama, T., Wang, T.L., Guggino, W.B., Cutting, G. y Uhl, G.R. (1993) GABA ρ2 receptor pharmacological profile: GABA recognition site similarities to ρ1. *Eur. J. Pharm.* **245**:83-84.

Lardelli, M. y Lendahl, U. (1994) Generating bacteriophage lambda sublibraries enriched for rare clones. *Biotechniques*. **16**:420-422.

LaVallie, E. (1988) Expression and Purification of Maltose-Binding Protein Fusions. En: Current protocols in molecular biology. Editado por F. M. Ausubel. New York. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience 16.6.1-16.6.14.

Leidenheimer, N.J., McQuilkin, S.J., Hahner, L.D., Whiting, P. y Harris, R.A. (1992) Activation of protein kinase C selectively inhibits the γ-aminobutyric acidA receptor: role of desensitization. *Mol. Pharm.* **41**:1116-1123.

Lin, Y.F, Angelotti, T.P., Dudek, E.M., Browning, M.D. y Macdonald, R.L. (1996) Enhancement of recombinant α1β1γ2l γ-aminobutyric acidA receptor whole-cell currents by protein kinase C is mediated through phosphorylation of both β1 and γ2L subunits. *Mol. Pharm.* **50**:185-95.

Liu, Y. y Lasater, E.M. (1995) Characterization of $GABA_A$ and $GABA_C$ receptors in turtle retinal ganglion cells *Soc. Neurosci.* Abstracts. **21**: 355.

Liu, Z.F., Kamatchi, G.L., Moreira, T., Mu, W. y Burt, D.R. (1998) The α5 subunit of the murine type A GABA receptor. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* **59**:84-89.

Lopez, A.J. (1998) Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Ann. Rev. Gen.* **32**:279-305.

Lukasiewicz, P.D. y Shields, C.R. (1998) Different combinations of $GABA_A$ and $GABA_C$ receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses. *J. Neurophys.* **79**:3157-3167.

Lukasiewicz, P.D. y Wong, R.O. (1997) $GABA_C$ receptors on ferret retinal bipolar cells: a diversity of subtypes in mammals? *Vis. Neurosci.* **14**: 989-994.

Lukasiewicz, P.D., Maple, B.R. y Werblin, F.S. (1994) A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina. *J. Neurosci.* **14**:1202-1212.

Luque, J.M., Bleuel, Z., Malherbe, P. y Richards, J.G. (1994) Alternatively spliced isoforms of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 are differentially distributed within the rat spinal cord. *Neurosci.* **63**:629-635.

Machu, T.K., Mihic, S.J. y Dildy-Mayfield, J.E. (1998) Selective actions of a detergent on ligand-gated ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharm. Exp. Ther.* **284**:32-36.

Martinez-Torres, A., Vazquez, A.E., Panicker, M.M. y Miledi, R. (1998) Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the ρ1 γ-aminobutyrate receptor *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 4019-4022.

Matute, C. Pulakat, L. Rio, C., Valcarcel, C., Miledi, R. (1994) Properties of angiotensin II receptors in glial cells from the adult corpus callosum. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**:3774-3778.

McDonald, B.J. y Moss, S.J. (1994) Differential phosphorylation of intracellular domains of γ-aminobutyric acid type A receptor subunits by calcium/calmodulin type 2-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **269**:18111-18117.

McKinley, D.D., Lennon, D.J. y Carter, D.B. (1995) Cloning, sequence analysis and expression of two forms of mRNA coding for the human β2 subunit of the $GABA_A$ receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **28**:175-179.

Miledi, R. (1982) A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Royal. Soc. London.* **215**:491-497.

Miledi, R., Parker, I. y Sumikawa, K. (1989) Transplanting receptors from brain into oocytes. En: Fidia Research Foundation Award Lectures. Raven Press. Nueva York. pp 57-90.

Mileo, A.M., Monaco, L., Palma, E., Grassi, F., Miledi, R. y Eusebi, F. (1995) Two forms of acetylcholine receptor γ subunit in mouse muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**:2686-2690.

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M. y Unwin N. (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 A resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J. Mol.Bio.* **288**:765-786.

Moss, S.J., Doherty, C.A. y Huganir, R.L. (1992a) Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the α1, γ2S, and γ2L subunits of the _-aminobutyric acid type A receptor. *J. Biol. Chem.* 267:14470-14476.

Moss, S.J., Smart, T.G., Blackstone, C.D. y Huganir, RL. (1992b) Functional modulation of $GABA_A$ receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation. *Science.* **257**:661-665.

Murata, Y., Woodward, R.M., Miledi, R. y Overman, L.E. (1996) The first selective antagonist for a $GABA_C$ receptor *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 7:2073-2076.

Narahashi, T., Ma, J.Y., Arakawa, O., Reuveny, E. y Nakahiro, M. (1994) GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell. Mol. Neurobio.* **14**:599-621.

Nelson, R., Schaffner, A.E., Li, Y.X. y Walton, M.K. (1999) Distribution of $GABA_C$-like responses among acutely dissociated rat retinal neurons. *Vis. Neurosci.* **16**: 179-190.

Ni, Y.G., Panicker, M.M. y Miledi, R. (1997) Efficient coupling of 5-HT1a receptors to the phospholipase C pathway in *Xenopus* oocytes. *Brain Res. Mol.Brain Res.* **51**:115-122.

Nicholls, J. G., Bruce, R.M. y Wallace, G. (1992) From neuron to brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system. 3ra ed. Sunderland. Mass. Sinauer Associates.

O'Hara, B.F., Andretic, R., Heller, H.C., Carter, D.B. y Kilduff, T.S. (1995) $GABA_A$, $GABA_C$, and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **28**:239-250.

Ogurusu, T., Eguchi, G. y Shingai, R. (1997) Localization of γ-aminobutyric acid (GABA) receptor ρ3 subunit in rat retina. *Neuroreport.* **8**:925-927.

Orser, B.A., McAdam, L.C., Roder, S. y MacDonald, J.F. (1998) General anaesthetics and their effects on $GABA_A$ receptor desensitization. *Toxicology Lett.* **100**:217-24.

Pearson, R.B. y Kemp, B.E. (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Meth. Enzym.* **200**:62-81.

Pedrotti, B. e Islam, K. (1996) Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *Febs Letters.* **388**:131-133.

Pedrotti, B., Ulloa, L., Avila, J. e Islam, K. (1996) Characterization of microtubule-associated protein MAP1B: phosphorylation state, light chains, and binding to microtubules. *Biochem.* **35**:3016-3023.

Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. y Bock S.C. (1994) A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase *Nucl. Acids. Res.* **22**:2587-2591.

Polenzani, L., Woodward, R.M. y Miledi, R. (1991) Expression of mammalian γ-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:4318-4322 (1991).

Pritchett, D.B., Sontheimer, H., Gorman, C.M., Kettenmann, H., Seeburg, P.H. y Schofield, P.R. (1988) Transient expression shows ligand gating and allosteric potentiation of $GABA_A$ receptor subunits. *Science*. 242:1306-1308.

Qian, H. y Dowling, J.E. (1993) Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature*, **361**:162-164.

Qian, H. y Dowling, J.E. (1994) Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina *J. Neurosci.* **14**:4299-4307.

Qian, H. y Dowling, J.E. (1995) $GABA_A$ and $GABA_C$ receptors on hybrid bass retinal bipolar cells. *J. Neurophys.* **74**:1920-1928.

Qian, H., Dowling, J.E. y Ripps, H. (1998) Molecular and pharmacological properties of GABAρ subunits from white perch retina. *J. Neurobio.* **37**:305-320.

Qian, H., Hyatt, G., Schanzer, A., Hazra, R., Hackam, A.S., Cutting, G.R. y Dowling J.E. (1997) A comparison of $GABA_C$ and ρ subunit receptors from the white perch retina. *Vis. Neurosci.* **14**:843-851.

Ragozzino, D., Woodward, R.M., Murata, Y., Eusebi, F., Overman, L.E. y Miledi, R. (1996) Design and *in vitro* pharmacology of a selective γ-aminobutyric acid C receptor antagonist. *Mol. Pharm.* **50**:1024-1030.

Revah, F., Bertrand, D., Galzi, J.L., Devillers-Thiery, A., Mulle, C., Hussy, N., Bertrand, S., Ballivet, M. y Changeux, J.P. (1991) Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature*. **353**:846-849.

Ruiz, A., Borrego, S., Marcos, I. y Antinolo, G. (1998) A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain γ-aminobutyric acid-receptor clusters. *Am. J. Hum. Gene.* **62**:1452-1459

Russek, S.J. y Farb D.H. (1994) Mapping of the β2 subunit gene (GABRB2) to microdissected human chromosome 5q34-q35 defines a gene cluster for the most abundant $GABA_A$ receptor isoform. *Genomics*, **23**:528-533.

Russek, SJ. (1999) Evolution of $GABA_A$ receptor diversity in the human genome. *Gene*. **227**:213-222.

Salceda, R., Vazquez, A.E. y Miledi, R. (1993) Expression of GABAρ receptor mRNA in the vertebrate retina. (23rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, D.C., USA, November 7-12, 1993) Society for Neuroscience Abstracts.**19**: 91.

Sambrook, J. Fritsch, T. y Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2da ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor EUA.

Schofield, P.R., Pritchett, D.B., Sontheimer, H., Kettenmann, H. y Seeburg, PH. (1989) Sequence and expression of human $GABA_A$ receptor α1 and β1 subunits *Febs Lett*. **244**:361-364.

Shimada, S., Cutting, G. y Uhl, G.R. (1992) γ-Aminobutyric acid A or C receptor? γ-Aminobutyric acid ρ1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive γ-aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharm*. **41**:683-687.

Shingai, R., Yanagi, K., Fukushima, T., Sakata, K. y Ogurusu, T. (1996) Functional expression of GABA ρ3 receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Res*. **26**:387-390.

Singer, M. y Berg, P. (1991) Genes & genomes: a changing perspective. Mill Valley, Calif. EUA: University Science Books.

Sinnett, D., Wagstaff, J., Glatt, K., Woolf, E., Kirkness, E.J. y Lalande, M. (1993) High-resolution mapping of the γ-aminobutyric acid receptor subunit β3 and α5 gene cluster on chromosome 15q11-q13, and localization of breakpoints in two Angelman syndrome patients. *Am. J. Hum. Gen*. **52**:1216-1229.

Strata, F. y Cherubini, E. (1994) Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development. *J. Physio.* **480**: 493-503.

Sumikawa, K., Parker, I. y Miledi, R. (1984) Messenger RNA from rat brain induces noradrenaline and dopamine receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc.* London. Series B: Biological Sciences. **223**:255-260.

Swaroop, A. y Weissman, S.M. (1988) Charon BS(+) and (-), versatile λ phage vectors for constructing directional cDNA libraries and their efficient transfer to plasmids. *Nuc. Acids Res.***16**: 8739.

Swope, S.L., Moss, S.J., Blackstone, C.D. y Huganir, R.L. (1992) Phosphorylation of ligand-gated ion channels: a possible mode of synaptic plasticity. *Faseb J.* **6**: 2514-2523.

Tia, S., Wang, J.F., Kotchabhakdi, N. y Vicini, S. (1996) Distinct deactivation and desensitization kinetics of recombinant $GABA_A$ receptors. *Neuropharmacology.* **35**:1375-1382.

Tigyi, G., Dyer, D., Matute, C. y Miledi, R. A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:1521-1525.

Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, C., Weiss, D.S. y Steinbach, J.H. (1997) Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the $GABA_A$ receptor. *J. Neurosci.* **17**:625-634.

Unwin, N. (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature.* **373**:37-43.

Unwin, N. (1996) Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the α subunits. *J. Mol.Bio.* **257**:586-596.

Unwin, N. (1998) The nicotinic acetylcholine receptor of the *Torpedo* electric ray. *Structural Biol.* **121**:181-90.

Wang, T.L., Guggino, W.B. y Cutting, G.R. (1994) A novel γ-aminobutyric acid receptor subunit (ρ2) cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 14:6524-6531.

Wang, T.L., Hackam, A., Guggino, W.B. y Cutting, GR. (1995) A single histidine residue is essential for zinc inhibition of GABA ρ1 receptors *J. Neurosci.*15: 7684-7691.

Wang, Z. y Grabowski, P.J. (1996) Cell- and stage-specific splicing events resolved in specialized neurons repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. *RNA.* 3:996-1015.

White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M. y Marshall, F.H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional $GABA_B$ receptor. *Nature.* 396:679-682.

Whiting, P.J., McAllister, G., Vassilatis, D., Bonnert, T.P., Heavens, R.P., Smith D.W., Hewson, L., O'Donnell, R., Rigby, M.R. y Sirinathsinghji, D.J. (1997) Neuronally restricted RNA splicing regulates the expression of a novel $GABA_A$ receptor subunit conferring atypical functional properties. *J. Neurosci.* 17:5027-5037.

Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. (1992a) Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive γ-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl^- channel inhibitors. *Mol. Pharm.* 42:165-73

Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. (1992b) Effects of hexachlorocyclohexanes on γ-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by RNA from mammalian brain and retina. *Mol. Pharm.* 41:1107-1115.

Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. (1992c) Effects of steroids on γ-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by poly(A)+ RNA from mammalian brain and retina. *Mol. Pharm.* 41:89-103.

Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. (1993) Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (ρ-like) γ-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of γ-amino butyric acidA and γ-amino butyric acidB receptor agonists and antagonists. *Mol. Pharm.*, **34**:609-25.

Wu, F.S., Gibbs T.T. y Farb D.H. (1993) Dual activation of $GABA_A$ and glycine receptors by β-alanine: inverse modulation by progesterone and 5 α-pregnan-3 α-ol-20-one. *Eur. J. Pharm.* **246**:239-246.

Xue, H. (1998) Identification of major phylogenetic branches of inhibitory ligand-gated channel receptors. *J. Mol. Evol.* **47**:323-333.

Yeh, H.H., Grigorenko, E.V. y Veruki M.L. (1996) Correlation between a bicuculline-resistant response to GABA and $GABA_A$ receptor ρ1 subunit expression in single rat retinal bipolar cells. *Vis. Neurosci.* **13**:283-292.

Zhang, D., Pan, Z.H., Zhang, X., Brideau, A.D. y Lipton S.A. (1997) Cloning of a γ-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**:11756-11760.

Zhang, L. Ashiya, M., Sherman, T.G. y Grabowski P.J. (1996) Essential nucleotides direct neuron-specific splicing of γ2 pre-mRNA. *RNA.* **2**:682-698.

Zhang, L., Liu, W. y Grabowski P.J. (1999) Coordinate repression of a trio of neuron-specific splicing events by the splicing regulator PTB. *RNA.* **5**:117-130.

Zhu, W.J., Wang, J.F., Corsi, L. y Vicini S. (1998) Lanthanum-mediated modification of $GABA_A$ receptor deactivation, desensitization and inhibitory synaptic currents in rat cerebellar neurons. *J. Physio.* **511**:647-661.

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO