



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Andrés Couve

Instituto de Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

Profesor Copatrocinante

Dr. Carlos González F.

Instituto de Fisiología

Facultad de Medicina

**PARTICIPACIÓN DE LOS EXTREMOS CARBOXILO
TERMINALES DEL RECEPTOR GABA_B EN SU
DESENSIBILIZACIÓN, ESTABILIDAD Y MOVIMIENTOS
LATERALES EN MEMBRANA CELULAR**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de ***Bioquímico***

LISETTE PAMELA SANDOVAL GALARCE

VALDIVIA – CHILE

2006

*Por lo que quisiste hacer y lo postergaste
para dedicarte a tus hijos.
Porque la vida no puede ser solo injusticia.
Porque mis logros son en realidad nuestros.*

*Por todo esto y más, dedico esta tesis
a mi mejor amiga, mi Madre.*

Agradecimientos

En esta página quiero plasmar sentimientos que habitualmente quedan dentro mío y pocas veces son conocidos por las personas a las cuales se los debiera comunicar.

En primer lugar quiero agradecer al destino por haber tenido la oportunidad de conocer y aprender del Dr. Andrés Couve desde técnicas básicas de laboratorio hasta actitudes frente a los logros y desilusiones que esta vida nos presenta. Por alentarme ante mis desilusiones y por orientarme cuando me desviaba del camino.

Sin duda debo agradecer a cada una de las tantas personas que aportaron un granito de arena para realizar esta tesis y en especial a René Vidal quien debió escucharme muchas veces, aportándome conocimiento y cariño.

Muchas gracias a las personas que nos acogieron en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y nos hicieron sentir como parte de esa institución.

Y por último pero no menos importante a mi familia quienes a pesar de no entender mucho lo que significa esta tesis me apoyaron en todas mis decisiones que a veces fueron un tanto radicales.

Este trabajo fue realizado en el Centro de estudios Científicos (CECS), Valdivia y en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Santiago y financiado gracias al apoyo del proyecto FONDECYT 1040083.

Indice de Contenidos

	<i>Página</i>
1 Resumen	1
1.1 Summary	2
2 Introducción	3
3 Materiales y Métodos	17
4 Resultados	33
4.1 <i>Los extremos C-terminal del receptor GABA_B no están implicados en la estabilidad de éste en la superficie celular luego del tratamiento crónico con agonista.</i>	33
4.1.1 Permanencia de receptores GABA _B nativos en la membrana plasmática de células COS-7 luego del tratamiento crónico con el agonista Baclofen.	33
4.1.2 Permanencia de receptores GABA _B delecionados del extremo carboxilo terminal en la membrana plasmática de células COS-7 luego del tratamiento crónico con el agonista.	39
4.2 <i>Los receptores GABA_B que permanecen estables en la membrana plasmática se desensibilizan en respuesta agonista.</i>	44
4.2.1 Los receptores GABA _B estimulan la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a agonista en células HEK293.	44
4.2.2 Desensibilización de GABA _B en respuesta al tratamiento crónico con Baclofen en células HEK293.	46
4.3 <i>El extremo carboxilo terminal de GABA_BR2 participa en la restricción de los movimientos laterales del receptor GABA_B en la membrana celular.</i>	50
4.3.1 La subunidad GABA _B R2 es móvil en la superficie celular de células HEK293	50
4.3.2 El receptor GABA _B experimenta movimientos laterales en membrana celular de células HEK293	64

4.3.3	Participación del extremo C-terminal de la subunidad GABA _B R2 en el movimiento en la membrana plasmática de células HEK293.	66
4.3.4	Efecto de la heterodimerización de las subunidades GABA _B R1/R2 en el movimiento en la membrana plasmática de células HEK293.	69
4.3.5	La proteína Mupp-1 no afecta los movimientos laterales de GABA _B R2-GFP en la membrana plasmática de células HEK293.	71
5	<i>Discusión</i>	77
6	<i>Bibliografía</i>	83

Indice de Figuras

		Página
Figura 1	Alineamiento de la secuencia aminoacídica de GABA _B R2 y GABA _B R1b	5
Figura 2	Acciones del receptor GABA _B en los terminales sinápticos	10
Figura 3	Gradiente de CsCl.	23
Figura 4	Inmunofluorescencia de subunidades recombinantes del receptor GABA _B en células COS-7.	34
Figura 5	Biotinilización de receptores de superficie GABA _B en células COS-7 después de tratamiento crónico con agonista.	37
Figura 6	Inmunofluorescencia de subunidades recombinantes del receptor GABA _B delecionadas de su extremo C-terminal en células COS-7.	40
Figura 7	Biotinilización de receptores de superficie GABA _B delecionadas de su extremo C-terminal en células COS-7 después de tratamiento crónico con agonista	42
Figura 8	Activación de la fosforilación de ERK por el receptor GABA _B en respuesta a baclofen	45
Figura 9	Activación de la fosforilación de ERK por GABA _B debido a tratamiento crónico con baclofen	48
Figura 10	Expresión funcional de GABA _B R2-GFP en células COS-7.	52
Figura 11	Ensayo de Recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueamiento (FRAP)	56
Figura 12	Recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueamiento (FRAP) de las proteínas EGFP y GAP43-GFP expresadas en células HEK293	58
Figura 13	FRAP de R2-GFP en células HEK.	61
Figura 14	Recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueamiento (FRAP) de R2-GFP en membranas de células HEK293.	63

Figura 15	FRAP del receptor GABA _B (R1/R2-GFP).	65
Figura 16	Recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueamiento (FRAP) de R2-GFP y R2ΔC-GFP expresados en células HEK293	67
Figura 17	FRAP del receptor GABA _B (R1/R2) y la subunidad GABA _B R2 en células HEK293.	70
Figura 18	Coexpresión de Mupp-1 y R2-GFP en células COS-7.	73
Figura 19	FRAP de R2-GFP y Mupp-1/R2-GFP en células HEK293	75

1. Resumen

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso en mamíferos. La acción lenta de GABA es mediada por el receptor GABA_B. El receptor GABA_B pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G trimérica, e interactúa específicamente con proteínas G_α del tipo G_{αi}. El receptor presenta características inusuales de funcionamiento como la heterodimerización obligatoria entre GABA_BR1 y GABA_BR2, las únicas dos subunidades conocidas, el aumento de la actividad en respuesta a la fosforilación por PKA y la ausencia de internalización desde la superficie celular.

En la presente tesis se investigó la participación de las secuencias carboxilo terminal del receptor GABA_B en la permanencia de éste en la membrana celular de células COS-7 mediante biotilización de proteínas de superficie y en los movimientos laterales realizando ensayos de Recuperación de la Fluorescencia luego del Fotoblanqueamiento (FRAP) en células HEK293. Adicionalmente se estudió el efecto de la proteína Mupp-1 en la movilidad de GABA_BR2 por FRAP y la desensibilización del receptor en respuesta a agonista evaluando el incremento de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 como efecto de la activación del receptor GABA_B. Los resultados obtenidos nos indican que la región carboxilo terminal del receptor GABA_B no afecta la permanencia de un *pool* de receptores estable en membrana celular luego de tratamiento crónico con agonista. Sin embargo, este dominio si participaría en la movilidad de GABA_BR2 en la superficie celular de células HEK293 disminuyéndola. Además, nosotros podemos concluir que la población de receptores GABA_B de membrana se desensibiliza parcialmente luego de tratamiento con agonista en células HEK293.

1.1 Summary

GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. The slow action of GABA is mediated by the GABA_B receptor. It belongs to the superfamily of G protein coupled receptors, and interact specifically with G_{αi}. The receptor presents unusual functional characteristics like the obligatory heterodimerisation between GABA_BR1 and GABA_BR2, the only two known subunits, the increase of activity due to PKA phosphorylation and the absence of internalization from the cellular surface.

In the present thesis we investigated the role of the carboxyl terminal domains of GABA_B receptors in their permanence in the cellular membrane and their lateral mobility. In order to achieve this, we have used biotinylation of surface proteins and Fluorescence Recover after Photobleaching assays (FRAP) in COS-7 and HEK293 cells. In addition, we have studied the effect of the protein Mupp-1 in the mobility of GABA_BR2 and the desensitization of receptor due to agonist binding. The results obtained indicate that the C-tail of GABA_B receptor did not affect the permanence of the *pool* of receptors at the plasma membrane. However, this domain participated in the lateral mobility of GABA_BR2 subunit at the cell surface of HEK293 cells as demonstrated by FRAP experiments. Moreover, we can conclude that the membrane population of GABA_B receptors is partially desensitized after agonist treatment in HEK293 cells.

2. Introducción

GABA es responsable de la inhibición sináptica lenta en SNC

La comunicación del sistema nervioso está a cargo de mensajeros químicos llamados neurotransmisores. Un alto porcentaje de ellos activan el potencial de acción en las neuronas blanco que expresan receptores para estos neurotransmisores. Para mantener el equilibrio en el sistema nervioso es necesario también que existan neurotransmisores que lleven a cabo la inhibición de los potenciales de acción generados. El principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso es el ácido γ -amino butírico (GABA) (Couve et al., 2004).

El primer receptor de GABA identificado fue el receptor ionotrópico GABA_A (Cain et al., 1982). En 1981 se describió un segundo receptor que presenta características que lo diferencian de GABA_A, y se le denominó GABA_B (Hill et al., 1981). Este último receptor es insensible a bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) y sensible al agonista baclofen (utilizado como agente antiespástico y relajante muscular). El receptor GABA_B se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (Calver et al., 2002).

El primer receptor GABA_B fue clonado en 1997 por Bettler y colaboradores, llamándolo GABA_BR1 (R1). Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores que presentan siete segmentos transmembrana y que se acoplan a proteína G (GPCR) (fig. 1). Lo anterior lo clasifica como un receptor metabotrópico.

Posteriormente se clonó un segundo receptor de GABA denominado GABA_BR2 (R2) (Jones et al., 1998, Kaupmann et al., 1998, Kuner et al., 1999). GABA_BR2 también pertenece a la

la familia C de GPCR, familia a la cual pertenecen los receptores de glutamato metabotrópico, sensores de calcio, gustativos y otros.

```

GABABR2  MASPPSSGQPRPPPPPPPPARLLLPLLLSLLLWLAPGAWGTRGAPRPPSSPP...LSIMGLMPLTK 65
GABABR1b  .....MGPGGCTPVGWPLLLLVMAGVAPVWASHSPHLRPHPRVPPHPSSERRAVYIGALFP 60
      ▲
GABABR2  EVAKSGIRGVLPAVELAIEQIRN.ESSLRPYFLDLRLYDTECDNAKGLKAFYDAIKYGNHLMVFGGVC 134
GABABR1b  MSGGWPGGQACQPAVEMALEDVNSRRDILPDYELKLIHHD SKCDPGQATKYLVELLYNDPIKIIILMPG.C 129

GABABR2  PSVTSIIAESLQGWNLVQLSPAATTPLVADKKKYYPFRFTVPSDNVNPAILKLLKHFRWRRVGTLTQDV 204
GABABR1b  SSVSTLVAAEARMWNLIVLSYGSSSPALSNRQRFPTFFRTHPSATLHNPTRVKLFEKKGWKKIATIQT 199

GABABR2  QRFSEVRNDLTGVLYGEDIEISDTESFSNDPCTSVKCLKGNDVRIILGQFDQNMAAKVFCFAFEESMFGS 274
GABABR1b  EVFTSTLDDLEERVKEAGIEITFRQSFSDPAVPVKNLKRQDARIIVGLFYEYTEARKVFCVEVYKERLEFGK 269

GABABR2  KYQWIIPGWYEPAWWEQVHVEANSSRCLRRSLLAAMEGYIGVDFEPLSSKQIKTISGKTPQQYEREYNSK 344
GABABR1b  KYVWFLIGWYADNWFKTYDPSIN...CTVEEMTEAVEGHIITTEIVMLNPANTRSISNMTSQEFV.EKLT 335

GABABR2  RSGVGPSKPHGY...AYDGIWVIAKTLQRAMETLHASSRHQRIQDFNYTDHTLGKIIILNAMNETNFFG 409
GABABR1b  RLKRHPREETGGFQEAPLAYDAIWALALALNKTSGGGGRSG..VRLEDFNYNQITITDQIYRAMNSSSFE 403

GABABR2  VTGQVVF.RNGERMGTIKFTQFQDSREVVKVGEYNAVADTLEIINDTIRFQSGSEPPKDKTIILEQLRKISL 478
GABABR1b  VSGHVVFEDASGSRMAWTLIEQLQGGSYKKIGYDSTKDDLS.WSKTDKWIGGSPADQTLVIKTFRFLSQ 472

GABABR2  PLYSILSALTILGMIMASAFLEFNKRNQKLIKMSSPYMNLIILGMLSYASIFLFGLDGSPVSEKTF 548
GABABR1b  KLFISVSVLSSLGIVLAVVCLSFNIYNSHVRYIQNSQPNLNNLTAVGCSLALAAVFPGLDGYHIGRSQF 542

GABABR2  ETLCTVRTWILTVGYTTAFGAMFAKTWRVHAIKFNVMKK...KIIKDQKLLVIVGMLLIDLCLILICWQ 615
GABABR1b  PFVQCARLWLLGLGFLGYGSMETKIWWVHTVFTKKEEKKEWRKTLEPWKLYATVGLLVGMDVLTIAIQ 612

GABABR2  AVDPLRRTVERYSMEDPDAGRDISIRPLEHCENTHMTIWLGIYVAYKGLLMLFGCFLAWETRVNSIPAL 685
GABABR1b  IVDPLHRTIETFAKEEPKEDIDVSILPOLEHCSSKKNMTWLGIFYGYKGLLLLLGIFLAYETKSVSTEKI 682

GABABR2  NDSKYIGMSVYNVGMICIIIGAAVSFLTRDQPNVQFCIVALVIFCSTITLCLVFPKLITLRTNPDAAATQ 755
GABABR1b  NDHRAVGMAIYNVAVLCLITAPVTMILSSQQDAAFASFASLAIVFSSYITLVVLFVPMRRLITRGE... 748

GABABR2  NRRFQFTQNKKEDSKTSTSVTSVNQASTSRLEGLQSENHRLRMKITELDKDLLEVMTQLQDTPEKTTYI 825
GABABR1b  .....WQSETQDTMKTGSS.TNNNEEEKSRL..LEKENRELEKIIAEKEERVSELRHQLQSRQLRSRR 809

GABABR2  KQNHQELNDILSLGNFTESDGGKAILKNHLDQNPQLQWNTTEPSRTCKDPIEDINSPEHIQRRLSLQL 895
GABABR1b  HPPTPPDPSGGLPRGPSEPPDRLSCDGSRVHLLYK*..... 845

GABABR2  PILHHAYLPSIGVDASCVSPCVSPTASPRHRHVPPSFRVMVSGL*..... 940

```

Figura 1: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de GABA_BR2 y GABA_BR1b. Las flechas indican el sitio de corte del péptido señal. Los aminoácidos sombreados corresponden a los que se encuentran conservados en ambas secuencias. Las líneas horizontales indican las secuencias aminoacídicas transmembrana.

Para la subunidad R1 existen nueve variantes de empalme (Bettler et al., 2004), siendo las más abundantes R1_a, R1_b y R1_c. Las isoformas R1_a y R1_c se expresan principalmente en estadios fetales, mientras que la isoforma R1_b predomina en el cerebro adulto (Fritschy et al., 1999). Sin embargo, mediante el estudio de ratones *KO* para cada isoforma de R1 se han puesto en evidencia diferencias de compartimentalización y función entre R1a y R1b en neuronas hipocampales, (Vigot et al., 2006, Pérez-Garci et al., 2006). En contraste el receptor R2 no presenta variaciones de empalme descritas hasta el momento (Martin et al., 2001).

Actividad del receptor GABA_B en terminales sinápticos

Estudios de microscopía electrónica dan cuenta de la localización del receptor GABA_B en terminales pre y postsinápticos (Kulik et al., 2003). En los terminales presinápticos el receptor GABA_B genera la inhibición de la liberación de neurotransmisor ya que inactiva canales de calcio tipo N-, L-, P- y Q- sensibles a voltaje (Dolphin et al., 1990, Scholz et al., 1991, Mintz et al., 1993) (Fig. 2a). A su vez, en el terminal postsináptico el receptor GABA_B contribuye a las corrientes inhibitorias lentas (hiperpolarización de la célula nerviosa) mediante la activación de canales de potasio rectificadores internos (GIRK o Kir3) (Gahwiler et al., 1985) (Fig. 2b).

Los receptores GABA_B responden a baclofen lo que afecta la liberación de neurotransmisores como glutamato, monoaminas y otros neuropéptidos, inhibiendo la liberación de estos en neuronas (Potashner et al., 1978, Bowery et al., 1980, Waldmeier et al., 1988). El mecanismo por el cual se obtienen estos efectos era desconocido hasta que se describió el receptor GABA_B para el cual baclofen es un agonista específico. Así al reportarse la existencia de receptores GABA_B en neuronas GABAérgicas y en neuronas liberadoras de neurotransmisores distintos a GABA (Calver et al., 2002), se evidenció un papel protagónico de los receptores GABA_B en la sinápsis inhibitoria del sistema nervioso central. Estos descubrimientos permiten

establecer que los receptores en terminales presinápticos actúan como auto y heteroreceptores, regulando así de manera importante la actividad del sistema nervioso central.

Heterodimerización del receptor GABA_B

La expresión de receptor R1 en células transfectadas evidencia una localización en el retículo endoplasmático (RE) y una ausencia de respuesta a agonista (Couve et al., 1998). El receptor R2 por su parte trafica para insertarse en membrana celular cuando es transfectado solo pero tampoco presenta actividad (Couve et al., 2000).

Sólo cuando R1 esta en presencia de R2 es capaz de escapar del RE para insertarse en la membrana plasmática, lo que reproduce la activación del receptor nativo. Por tanto R1 y R2 son subunidades del receptor GABA_B. Esto demuestra que la heterodimerización de R1 y R2 es necesaria y suficiente para la actividad del receptor (White et al., 1998).

La generación de ratones *knockout* (*KO*) de R1 se realizó el año 2001 (Schuler et al., 2001, Prosser et al., 2001). Estos ratones son viables y presentan pérdida de las respuestas químicas y electrofisiológicas por completo del receptor GABA_B, en las acciones pre y postsinápticas.

Los ratones *KO* de R1 experimentan ataques epilépticos espontáneos, hiperalgesia, actividad locomotor aumentada y severa pérdida de memoria. Luego, en el año 2004 se generó un ratón *KO* para R2, el cual presenta el mismo fenotipo del ratón deficiente de R1. Estos resultados indican que la ausencia de actividad del receptor GABA_B es responsable del fenotipo observado en los ratones *KO* (Gassman et al., 2004). La similitud del fenotipo obtenido con ambas subunidades representa una evidencia adicional para postular que los receptores GABA_B funcionan como un heterodímero *in vivo*.

Tanto R1 como R2 presentan una secuencia amino terminal en el extracelular que puede adoptar una estructura globular bilobulada capaz de unir ligando. La secuencia de unión a ligando de R1 está ampliamente conservada desde *Caenorhabditis elegans* a humano, mientras que la secuencia amino terminal de R2 a sufrido cambios evolutivos que la hacen poco conservada de especie en especie (Kniazeff et al., 2002). Esto atribuye una implicancia protagónica del dominio extracelular de R1 en la unión del ligando. Los análisis de subunidades R1 truncadas y quiméricas demuestran que todos los determinantes de la unión a agonista y antagonista están presentes en el dominio amino terminal de esta subunidad (Malitschek et al., 1999).

La delección del extremo C-terminal de R1 permite a la subunidad traficar e insertarse en la membrana plasmática en ausencia de R2 (Grünewald et al., 2002). Análisis de residuos del extremo C-terminal de R1, demuestran que la secuencia RSRR ubicada entre los residuos aminoacídicos 806 y 809, es la responsable de la retención de R1 en el RE. Adicionalmente un motivo dileucina ubicado hacia el extremo amino terminal del dominio intracelular carboxilo terminal facilita el transporte de membrana de R1 (Calver et al., 2001, Margeta-Mitrovic et al., 2000).

La llegada del heterodímero a la membrana celular requiere un enmascaramiento de la señal de retención reticular de R1 por parte de R2. Esto es llevado a cabo por dominios *coiled-coil* presente en los dominios intracelulares C-terminal de ambas subunidades (R1 y R2) (Calver et al., 2001).

Adicionalmente a la participación de R2 como chaperona que lleva a R1 a membrana celular dimerizando y enmascarando su secuencia de retención, esta subunidad tiene un rol crucial en la funcionalidad del receptor GABA_B, ya que interactúa, y es capaz de activar proteína G. Mediante mutaciones puntuales y delecciones tanto del extremo intracelular C-terminal como

de secuencias de los tres *loops* intracelulares que presenta tanto R1 como R2, se estableció la existencia de la interacción de R2 con proteína G en la cual los aminoácidos presentes en el segundo y tercer *loop* intracelular de esta subunidad, pero no en R1, son críticos para el acoplamiento (Duthey et al., 2001, Robbins et al., 2001). Esto constituye otro argumento en favor de la heterodimerización obligatoria del receptor GABA_B.

Modelo de activación del receptor GABA_B

La evidencia acumulada hasta hoy permite postular un modelo de activación del receptor GABA_B en el cual la señalización del receptor se inicia con la unión del agonista al dominio extracelular de R1, lo cual provoca un cambio conformacional en la región transmembrana de R2 que produce el acoplamiento de esta región a proteína G_i, desencadenándose la activación de eventos de señalización río abajo (Galvez et al., 2001).

La interacción con proteína G_i de R2, produce la liberación de la subunidad α de la proteína trimérica, la cual interacciona con adenilato ciclasa disminuyendo los niveles intracelulares de AMPc, activándose rutas de señalización intracelular que llevan a cabo las actividades del receptor en los terminales nerviosos pre y postsinápticos (Fig. 2).

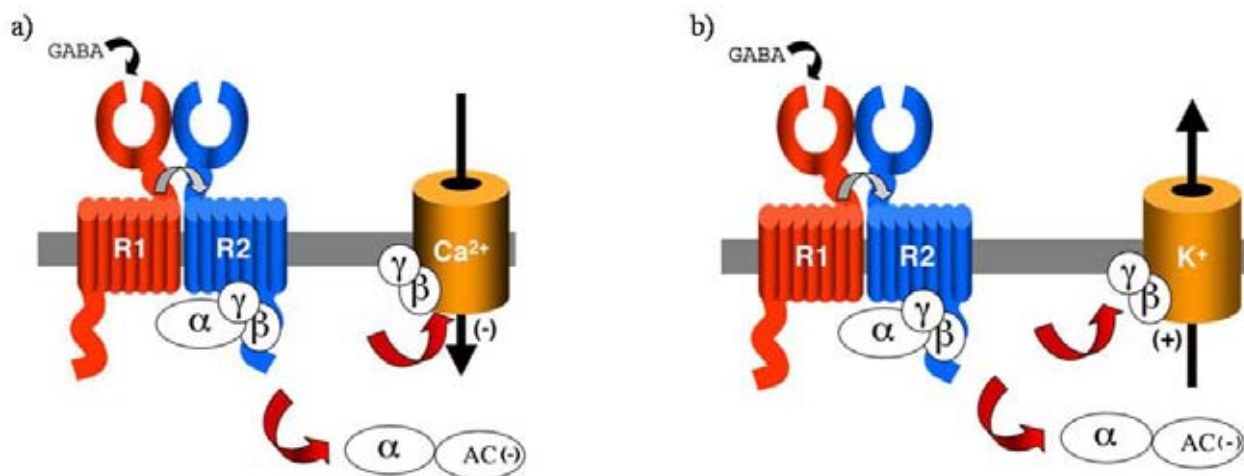


Figura 2. **Acciones del receptor GABA_B en los terminales sinápticos.** La unión del agonista GABA a la subunidad R1 genera el acoplamiento de la subunidad R2 a la proteína G ($\alpha\beta\gamma$). La subunidad α inhibe la actividad de adenilato ciclasa (AC). a) En terminales presinápticos las subunidades $\beta\gamma$ inhiben canales de calcio. b) En terminales postsinápticos las subunidades $\beta\gamma$ activan canales de potasio.

Interacciones del receptor GABA_B con proteínas

Si bien la cotransfección de R1 y R2 reproduce la actividad del receptor nativo, farmacológicamente presentan diferencias con los receptores endógenos. Debido a la inexistencia de otras subunidades del receptor que expliquen estas diferencias (datos no publicados), es posible que la farmacología del receptor sea fuertemente influenciada por enzimas y/o proteínas intracelulares, como se ha descrito para los receptores de glutamato (mGluRs) y las proteínas Homer (Ango et al., 2002).

Los dominios C-terminal de R1 y R2 presentan secuencias consenso para la fosforilación por proteína kinasa A (PKA) y proteína kinasa C (PKC) (Couve et al., 1999). Pero sólo para la subunidad R2 se ha demostrado la fosforilación por PKA (*in vitro*) en un residuo de Serina específico (Ser 892) presente en el dominio C-terminal (Couve et al., 2002).

Adicionalmente a la acción de PKA, se han reportado interacciones del receptor GABA_B con otras proteínas *in vitro* (*screening* de doble híbrido en levaduras y otras técnicas proteómicas).

El dominio C-terminal de R1 interactúa con miembros de la familia de proteínas 14-3-3 en la secuencia de retención RRSR (Couve et al., 2001), proteínas implicadas en el ensamblaje de receptores en la membrana celular (Yuang et al., 2003), traducción de señal de GPCR (Benzina et al., 2000), interacción con fosfoproteínas (Muslin et al., 1996) y regulación de la transmisión sináptica por canales de potasio (Zhou et al., 1999). Adicionalmente la proteína del complejo de revestimiento I (COPI) también interactúa con la subunidad R1 en la misma secuencia que lo hace la proteína 14-3-3, lo que llevó a proponer un mecanismo de competición entre estas dos para el control de la expresión en la superficie del heterodímero. Pero fue descartado

demostrándose que solo la interacción con COPI controla el tráfico hacia la superficie celular del receptor GABA_B (Brock et al., 2005).

Además, asociaciones del receptor GABA_B con factores de transcripción, postulan un nuevo mecanismo de interacción directa entre receptor y este tipo de factores. El factor transcripcional ATF4, también conocido como CREB2, interactúa con el extremo C-terminal de R1 (Nehring et al., 2000). Mientras que para el segmento intracelular de R2 se ha reportado una interacción con el factor de transcripción CHOP (Sauter et al., 2001).

Un representante de proteínas con dominios PDZ, la proteína Mupp-1, interactúa *in vitro* con el dominio C-terminal de la subunidad R2 (Ige et al., 2001). El dominio intracelular de esta subunidad también se ha reportado que interactúa con el factor sensible a N-Etilmaleimido (NSF) (White et al., 2002, Portier et al., 2006), proteína crítica en el tráfico de membrana intracelular.

Para la subunidad R1 se conoce un menor número de interacciones, que en parte puede deberse a la existencia de un extremo C-terminal de mayor tamaño en R2 con respecto al mismo dominio de R1 (ver fig. 1). Además de la interacción con ATF4, 14-3-3 y COPI, la subunidad R1 interactúa con la proteína Marlin-1 (proteína con múltiples α -hélices que une RNA) (Couve et al., 2004), demostrándose que la disminución de Marlin-1 en neuronas (mediante siRNA) resulta en un aumento de los niveles de R2 intracelulares. Esto involucra a Marlin-1 en la regulación de los niveles de producción del receptor GABA_B funcional.

Las evidencias de las interacciones de las subunidades del receptor GABA_B con múltiples proteínas, plantea que en sus dominios intracelulares existe un complejo de proteínas centradas alrededor de él, llamado “signalosoma” que se ha descrito para otros GPCRs (El Far et al., 2002). Este signalosoma posiblemente estaría facilitando la unión de las subunidades del receptor a

componentes relevantes para la señalización intracelular, estructura y transporte, elementales para la actividad del receptor y la arquitectura celular que le permitirá cumplir con sus funciones en los terminales sinápticos. Apoyando esta idea se reportó la presencia del receptor en balsas lipídicas (Becher et al., 2001), las cuales se encuentran en regiones de la membrana celular y que se ha sugerido que pueden actuar como plataforma de ensamblaje de complejos de señalización intracelular.

Desensibilización y estabilidad del receptor GABA_B

Existen dos tipos de desensibilización descritas para los GPCRs: desensibilización homóloga, que es producto del acoplamiento del agonista al receptor, en la cual participan kinasas de GPCRs (GRK) y arrestina, y desensibilización heteróloga, causada por la activación de otros receptores, mediada por PKA y PKC (Chuang et al., 1996, Tsao et al., 2000). Ambas vías resultan en una internalización del receptor, siendo la activación de ellas una modulación negativa de la presencia de los receptores en la membrana celular.

Se postula que el receptor GABA_B presenta una desensibilización heteróloga, mediada por PKA (Couve et al., 2002). Pero esta fosforilación aumenta la estabilidad del receptor en la membrana celular y no desencadena su internalización (Fairfax et al., 2004). La fosforilación de R2 por PKA disminuye en presencia de agonista (Couve et al., 2002), teniendo el receptor niveles basales de fosforilación. Esto se produciría debido al acoplamiento del receptor a proteína G_{oi}, la cual reduce los niveles de AMP cíclico (cAMP) intracelulares con un consecuente descenso en la actividad de PKA (que es una proteína quinasa dependiente de cAMP). Estos resultados sugieren que el receptor GABA_B no se desensibiliza por la clásica vía β-arrestina-dependiente.

Por otro lado el tratamiento prolongado (1 hr) con agonista de los receptores GABA_B produce desensibilización cuando la proteína kinasa 4 de GPCR (GRK4) es coexpresada con el

receptor en células HEK293 (Perroy 2003), lo cual sugiere una desensibilización del receptor homóloga. Sin embargo el dominio kinasa de GRK4, y por tanto la fosforilación del receptor GABA_B, no es requerido para la desensibilización del receptor (Perroy et al., 2003). Además es poco probable que este tipo de desensibilización represente un mecanismo general, ya que GRK4 esta ausente en varias regiones del cerebro en las cuales el receptor GABA_B es expresado en niveles elevados

Independiente de cual sea la vía de desensibilización del receptor GABA_B, esta debería resultar en una internalización del receptor. Sin embargo se ha reportado que la presencia de receptores en la membrana de neuronas corticales no varía sino luego de 60 hrs. de incubación con agonista (Fairfax et al., 2004).

El único estudio que reporta la desensibilización y consecuente internalización del receptor luego de 2 hrs de tratamiento con baclofen (Gonzalez–Maeso et al., 2003), fue realizado en la línea celular CHO-K1. Estos resultados no se han reproducido en las líneas celulares habitualmente usadas para el estudio de este receptor (COS-7 y HEK293), ni en cultivos neuronales (Fairfax et al., 2004, Couve et al., 2002).

La presencia de receptores GABA_B en balsas lipídicas (Becher 2001) sugiere una dinámica de movimientos laterales que posibilitan la existencia de los receptores en estos dominios. Esta dinámica podría apoyar la idea de que los receptores GABA_B presentan una alta movilidad en la membrana plasmática lo que les permitiría insertarse y endocitarse de esta con cierta facilidad. Dando cuenta de esto la estabilidad que presentan estos receptores en la membrana celular (Fairfax et al., 2004). Además esta dinámica podría estar influenciada por la interacción del receptor con proteínas intracelulares presentes en dominios de la membrana celular, que diferirían según el tipo celular.

Cuando hablamos de estabilidad o permanencia de un receptor en la membrana celular involucramos fenómeno como interacciones entre proteínas que mantienen al receptor en una ubicación determinada en la membrana celular. Las interacciones que “retienen” a los receptores en la membrana celular habitualmente se llevan a cabo entre proteínas citoplasmáticas y dominios intracelulares de los receptores. De acuerdo a esto es razonable pensar en una participación del extremo C-terminal de las subunidades del receptor GABA_B en el mantenimiento de los receptores en la superficie celular.

A pesar del gran número de estudios que se han realizado en torno a resolver los mecanismos que hacen diferente al receptor GABA_B del resto de la familia C de GPCR, aún quedan aspectos de este receptor sin conocer, en especial los relacionados con la estabilidad del receptor en la membrana, su desensibilización en la membrana plasmática y la interacción de éste con proteínas del signalosoma *in vivo*.

De acuerdo a lo anterior decidimos postular la siguiente hipótesis:

“Los extremos carboxilo terminal del receptor GABA_B participan en su desensibilización, estabilidad y movimiento laterales en la membrana celular, estos últimos además son afectados por interacciones con proteínas de unión a citoesqueleto”.

La presente tesis tuvo como objetivo general:

Estudiar aspectos relacionados con los mecanismos que rigen la permanencia, actividad, movimiento e interacción con proteínas intracelulares del receptor GABA_B en la membrana plasmática de líneas celulares.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la variación en la membrana plasmática de células COS-7 de la población de receptores GABA_B recombinantes en respuesta a la acción de agonista.
- Determinar la variación en la membrana plasmática de células COS-7 de la población de receptores delecionados de su región carboxilo terminal en respuesta a la acción de agonista para el receptor GABA_B.
- Establecer la sensibilidad del receptor GABA_B nativo para responder a agonista luego de incubación crónica en células HEK293.
- Establecer la participación de la región carboxilo terminal de R2 en los movimientos laterales que experimenta esta subunidad en la membrana plasmática de células HEK293.
- Establecer la participación en los movimientos laterales del receptor GABA_B en la membrana plasmática de la subunidad R1 en presencia de R2.
- Explorar la participación de la proteína Mupp-1 en los movimientos laterales en la membrana plasmática de la subunidad R2 del receptor GABA_B.

3. Materiales y métodos

Materiales

Reactivos

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron adquiridos a las siguientes empresas:

Sigma Chemical Co.: Cloruro de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS), Cloruro de Cesio, Butanol, Glutamina, Acrilamida-bis-acrilamida (29:1), Persulfato de amonio, N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), ácido etilendiamonotetraacético (EDTA), octylphenoxy poli(etilenoxi)etanol (IGEPAL), L-baclofen (baclofen), Cloruro de amonio, Poli-L-lisina, Bromuro de etidio, ácido deoxicólico (DOC), ácido etilen glicol bis(2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetra acético (EGTA), hidróxido de sodio, paraformaldehido (PAF), cianol de xileno, cloruro de potasio, azul de bromofenol, ampicilina, kanamicina, fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), Triton X-100, glucosa, Anti- β -tubulina, Anti-c-myc, Anti-HA.

Pierce, Rockford, USA : Immobilized Neutravidin (neutravidina), EZ-Link Sulfa-NHS-LC-Biotin (biotina), Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate.

Merck, Darmstadt, Alemania : ácido acético glacial, cloruro de sodio, etanol, isopropanol, fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), acetato de potasio, acetato de amonio, acetato de sodio.

Winkler, Santiago. Chile : Tris(hidroximetil)aminometano, albúmina sérica de bovino (BSA), tween-20, glicina, glicerol, ácido (N(2 hidroxietilpiperazina-N(2 etansulfónico)) (Hepes), estándar de peso molecular preteñido.

Amersham Corp., Piscataway, USA : Placas fotográficas Hyperfilm ECL, Anti-mouse Ig, acoplado a ^{125}I .

Gibco BRL, Inc.: Opti-MEM, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alta glucosa, bicarbonato de sodio, Fungizona, peptona, extracto de levadura, tripsina.

Invitrogen Corp.: Agar, lipofectamina, reactivo Plus.

Bio Rad : Inmuno-Blot Membrana (PVDF).

Boeringher-Mannhein : inhibidor de proteasa fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF).

Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA : Anti-mouse IgG acoplado a Rodamina (TRITC), Donkey Anti-mouse IgG acoplado a Peroxidasa de rábano picante (HRP).

Santa Cruz Biotecnology : Anti-Fosfo-ERK1/2, anti-ERK1/2 total.

Molecular Probes, Oregon, USA : Anti-mouse IgG Alexa 546.

Biological Industrias, Israel : Suero de bovino fetal (FBS) , suero bovino de caballo (FCS).

Kodak Brasil : Líquido revelador y fijador.

Svelty Chile : leche descremada en polvo.

QIAGEN USA : QIAGEN Plasmid Midi Kit.

Vector laboratorios, Burlingame, USA : medio de montaje Vectashield.

Pamela Grant Chile: esmalte de uñas translucido.

Porta objeto, cubreobjeto.

Equipos

Agitador Environ shaker (Lab-Line), baño termorregulado (Mettler), Multi-blok (Lab-Line), ultracentrífuga (Beckmann), espectrofotómetro (Termo Spectronic), Electroporador Gene pulser X cell (Bio-Rad), cámara de flujo laminar (Forma Scientific), incubadora Water-Jacketed (Forma Scientific), cámara de electroforesis geles agarosa (Bio-Rad), cámara de electroforesis geles acrilamida cual (Bio-Rad), cámara de transferencia (Bio-Rad), microscopio (Ikon), microscopio de epifluorescencia Eclipse (Nikon), microscopio confocal (Zeiss), pantalla K de exposición para Molecular Imagen FX (Bio-Rad), centrífuga (Vibrax), centrífuga refrigerada (Beckman), transiluminador UV (Fotodyne Incorporated).

Métodos

Extracción de DNA plasmidial a escala intermedia (midiprep)

El protocolo utilizado fue el recomendado por QIAGEN para el kit de purificación de midipreparaciones de DNA “Plasmid Midi Kit”. Se aislaron colonias únicas de la placa LB–ampicilina o kanamicina y se cultivaron en 5 ml de medio LB–antibiótico (50 µg/µl) a 37°C por 12 h a 300 rpm. Del cultivo se extrajeron 100 µl y se adicionaron a 100 ml de LB-antibiótico para cultivarlos a 37 °C por 12 hrs a 300 rpm en un shaker. Luego, se centrifugó el cultivo a 6000 rpm por 15 min a 4°C y se resuspendió el precipitado en 4 ml de buffer P1. Se agregó 4 ml de buffer P2, mezclando por inversión y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 4 ml de buffer P3, se mezcló por inversión y se incubó por 15 min en hielo. Se centrifugó el lisado a 12000 rpm por 30 min a 4 °C y se extrajo el sobrenadante para centrifugarlo nuevamente a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. Se equilibró la columna con 4 ml de buffer QBT y se aplicó a esta el sobrenadante conteniendo el DNA plasmidial que ingresó a la resina por flujo gravitacional. Se lavó la columna dos veces con 10 ml de buffer QC. Luego se eluyó el DNA con 5 ml de buffer QF para luego precipitarlo con 3.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y se centrifugó a 10000 rpm por 30 min a 4 °C. Se lavó el precipitado con 2 ml de etanol 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante. Se secó el precipitado a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió en 20 µl de buffer TE 1x pH 8.0 (Tris 1 mM ph 7.4, EDTA 0.1 mM ph 8.0).

Extracción de DNA plasmidial a maxi escala (maxiprep) mediante gradiente de Cloruro de cesio

Se aislaron colonias únicas de una placa LB–ampicilina o kanamicina y se cultivaron en 5 ml de medio LB–ampicilina o kanamicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 37°C por 12 h a 300 rpm. Del cultivo se extrajeron 250 μl y se adicionaron a 250 ml de LB-ampicilina o kanamicina para cultivarlos a 37 °C por 12 hrs a 300 rpm en un shaker. Se centrifugó el cultivo bacteriano a 5500 rpm por 15 min a 4 °C. Se resuspendió el precipitado en 7 ml de solución I (glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) y se adicionaron 9 ml de solución II (NaOH 200 mM y SDS 2%) fresca, se mezcló por inversión y se dejó en hielo por 5 min. Se agregó 9 ml de solución III (KOAC 3 M y HOAc glacial 11.5% (v/v)), se mezcló vigorosamente y se dejó en hielo por 5 min. Posteriormente se centrifugó a 5500 rpm por 20 min a 4 °C. Se rescató el sobrenadante, se adicionó 1 volumen de isopropanol y se mezcló. Luego se centrifugó a 5500 rpm por 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 10 ml de tampón TE 10x (Tris 10 mM ph 7.4, EDTA 1 mM ph 8.0) pH 8.0, adicionando luego 1 ml de NH_4OAc 5 M y 2 volúmenes de etanol 95%. Se centrifugó a 5500 rpm por 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante. Nuevamente se resuspendió el precipitado en 3 ml de TE 10x, se midió el volumen y se agregó 1.1 g de CsCl por ml. Adicionalmente se agregaron 100 μl de bromuro de etidio (5 mg/ml), se mezcló y se transfirió a una tubo de ultracentrífuga para centrifugar, utilizando el rotor TLN 100, a 100000 rpm por 15 hrs a 20 °C. Se extrajo del gradiente la banda de DNA circular (fig. 3), se adicionó 1 volumen de agua saturada en butanol, se mezcló y se eliminó la fase rosada, repitiéndose la extracción hasta eliminar completamente el bromuro de etidio. El DNA plasmidial fue precipitado con 2 volúmenes de etanol y luego se centrifugó a 5500 rpm por 15 min a 4 °C. Se resuspendió el DNA en 1 ml de TE 10x, 0.1 volúmenes de NaOAc 3 M y etanol

95%. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Se lavó el precipitado con etanol 70% y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se resuspendió en 250 μ l de TE 1x (Tris 1 mM ph 7.4, EDTA 0.1 mM ph 8.0).

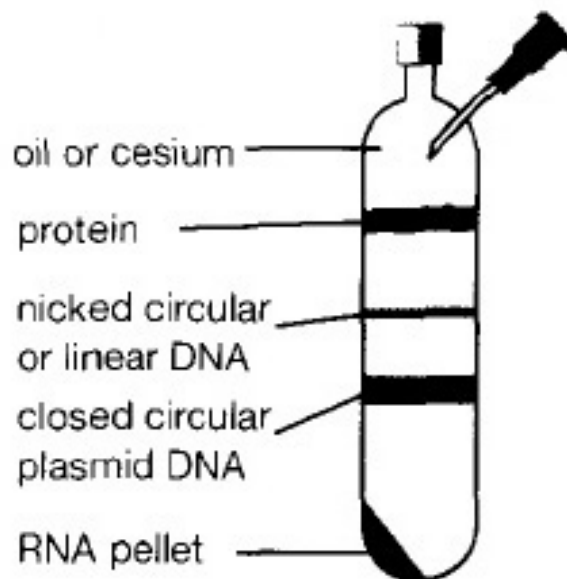


Figura 3: **Gradiente de CsCl.** Separación de los componentes de una extracción simple de DNA plasmidial. En la gradiente se visualiza de inferior a superior: el RNA, DNA circular, DNA digerido y proteínas.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para la identificación y separación de fragmentos de DNA, se prepararon geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Tris 20mM, ácido acético 10mM y EDTA 500µM) con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Se utilizó tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0.4% y cianol de xileno 0.4%) en relación 1:6, con respecto al volumen de la muestra y 0.5 µg de estándar de tamaño molecular para DNA de 1 Kb. Los fragmentos de DNA fueron fraccionados por 30 min a 100 Volt en tampón de corrida TAE 1x y el DNA se observó por exposición del gel sobre el transluminador UV.

Cuantificación de DNA

La determinación de la concentración de DNA se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de una dilución 1:500 de la preparación de DNA realizada, teniendo como patrón que una unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50 µg/ml para DNA de doble hebra, según Sambrook et al. (1989).

Cultivo celular

Se cultivaron células COS-7 y HEK293 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alta glucosa, suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado, 4 mM L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina y 0.25 µg/ml fungisona, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las células se subcultivaron cada 3 a 4 días lavándolas con PBS 1x y utilizando tripsina 1x por 3 - 5 min a 37°C.

Transfección de células eucariontes con lipofectamina

Las células se sembraron a una confluencia de 70% aproximadamente (día previo a la transfección) sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro tratados por 12 hrs con poli-L-lisina 0.01 mg/ml), depositados en placas de poliestireno de 60 mm de diámetro o directamente en placas de poliestireno con el mismo tratamiento, usando medio DMEM suplementado a 37 °C en un 5% de CO₂. Luego de 14 hrs previo subcultivo, se transfectaron con una mezcla que contenía 2 µg de DNA plasmidial, 6 µl de lipofectamina y 3 µl de reactivo plus según el protocolo descrito por el fabricante (Invitrogen). Los estudios se realizaron luego de 48 hrs postransfección.

Transfección de células eucariontes por electroporación

Las células se sembraron a una confluencia del 25% aproximadamente en una placa de 10 cm de diámetro (el día anterior), se lavaron con PBS 1x y se incubaron con tripsina 1x por 3 – 5 min a 37 °C, para luego adicionar DMEM suplementado. Se recolectaron y centrifugaron a 2000 rpm por 3 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 ml de Optimem y se centrifugaron nuevamente a 2000 rpm por 3 min a temperatura ambiente. Se eliminó bien el medio y se resuspendió en 200 µl de OptiMEM. A una cubeta de electroporación de células eucariontes, se adicionaron 3 µg de DNA plasmidial y 100 µl de la suspensión celular. Las células se electroporaron utilizando el protocolo preestablecido del electroporador para el tipo celular. Finalmente las células fueron transferidas a una placa de 60 mm de diámetro con 5 ml de medio DMEM suplementado y mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los estudios se realizaron luego de 48 hrs postransfección.

Inmunofluorescencia

Las células utilizadas estaban adheridas a cubreobjetos tratados con poli-L-lisina y transfectadas. Se extrajo un cubreobjeto de la placa de cultivo y se lavó con PBS 1x. Se incubó 15 min con PAF 1%. Luego se incubó dos veces con NH_4Cl 50 mM por 10 min en movimiento. Posteriormente se bloqueó por 10 min con solución de bloqueo (BSA 0.5%, FCS 10% en PBS 1x). Cuando se necesitó permeabilizar las células se incubó por 10 min con solución de permeabilización (BSA 0.01%, triton X-100 0.5% en PBS 1x), sino se incubó por el mismo tiempo con solución de lavado (BSA 0.5% en PBS 1x). Las células fueron colocadas por 1 hr a temperatura ambiente en contacto con el anticuerpo primario (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluido en solución de lavado (células no permeabilizadas) o solución de inmunofluorescencia (BSA 0.5%, triton X-100 0.01% en PBS 1x). Se lavó con solución de lavado tres veces por 10 min. La incubación con el segundo anticuerpo se realizó por 1 hr a temperatura ambiente, éste se diluyó (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en solución de lavado (células no permeabilizadas) o solución de inmunofluorescencia. Nuevamente se lavó con solución de lavado tres veces por 10 min. Luego se lavó con PBS 1x 20%, se eliminó el exceso de líquido y se montó el cubreobjeto en un portaobjeto sobre 2 μl de medio de montaje Vectashield sellándolo con esmalte de uñas.

Biotinilización de proteínas de superficie

Las células se transfectaron por electroporación, se permitió la expresión de los receptores por 48 hrs y luego las células se incubaron (o no) con Baclofen 100 μM por 12 hrs. Para la biotinilización se posó la placa en hielo y se lavó dos veces con PBS/ Ca_{2+} / Mg_{2+} (CaCl_2 1 mM, MgCl_2 0.5 mM en PBS 1x). Se incubó con 1 ml de reactivo de biotina (1mg/ml) disuelto en PBS/ Ca_{2+} / Mg_{2+} por 15 min. Luego se bloqueó con PBS/ Ca_{2+} / Mg_{2+} conteniendo glicina 50 mM tres veces por 5 min. Posteriormente se lavó dos veces con PBS/ Ca_{2+} / Mg_{2+} , se eliminó bien y se adicionaron 200 μl de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 50 mM, EGTA 5 mM, NaCl 0.5 M, IGEPAL 1%, DOC 0.5%, SDS 0.1%) a la placa. Las células se recolectaron transfiriéndolas a un tubo de 1.5 ml y se adicionó luego PMSF 2 mM. La solubilización de las proteínas se realizó por 1hr a 4°C. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a 4 °C, luego el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se almacenaron 20 μl de éste a -20 °C (alícuota de proteínas totales). Se agregó 50 μl de neutravidina y se incubó por 2 hrs a 4 °C. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 1 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó dos veces con RIPA conteniendo NaCl 500 mM y luego una vez con RIPA conteniendo NaCl 150 mM, se elimina bien. Finalmente se adicionó 40 μl de tampón de carga 3x (Tris 150 mM ph 8.0, SDS 6%, DTT 0.3 M, azul de bromo fenol 0.3%, Glicerol 30%) y se calentó el tubo tapado a 100 °C por 3 min. Luego se cargó la muestra en un gel de 8% acrilamida/bisacrilamida o se guardó a -20 °C.

Western blot

Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) según el método de Laemmli (1970) de tampón discontinuo con algunas modificaciones. Los geles se prepararon de acuerdo al tamaño de proteína que se necesitara detectar con distintos porcentajes de gel separador. De acuerdo a esto para detectar proteínas pequeñas como ERKs (44 Kd) se realizó un gel separador con 8% de acrilamida, mientras que para detectar una subunidad del receptor GABA_B (118 Kd) se realizó un gel separador con 10% de acrilamida. Los geles fueron preparados de acuerdo a las siguientes proporciones:

_Gel separador al 8%: Tris-HCl 0.38 M pH 8.3, acrilamida-bis-acrilamida 8%, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y TEMED 0.06%.

_Gel separador 10%: Tris-HCl 0.38 M pH 8.3 acrilamida-bis-acrilamida 10%, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y TEMED 0.06%.

_Gel espaciador al 5%: Tris-HCl 0.06 M pH 6.8, acrilamida-bis-acrilamida 5%, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y TEMED 0.06%.

Los geles se prepararon en placas de vidrio con espaciadores de 1.5 mm de espesor. Sobre el gel separador ya solidificado se colocó el gel espaciador. En todas las electroforesis se usó estándar preteñido de 19 KDa a 118 KDa. Una vez cargadas la muestra y el estándar. La electroforesis de las proteínas fue realizada con tampón de corrida (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%) a un voltaje constante de 100 V por aproximadamente 2 hrs 30 min

La electrotransferencia de proteínas a una membrana PVDF (activada con metanol antes de usar) se llevó a cabo según el método de Towbin (1979), con algunas modificaciones. El gel y la membrana, se empaquetaron por ambos lados en papel filtro y esponjas, todos humedecidos en el tampón de transferencia (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037%, metanol 20 %) y se

depositaron en una cámara de electrotransferencia donde la membrana se orientó hacia el polo positivo o ánodo del circuito. La transferencia se realizó a 370 mA por 2.5 hrs a 4 °C usando el tampón frío antes mencionado.

Una vez terminada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se desprendió del gel y se lavó por 10 min en PBS 1x.

Para la inmunodetección de proteínas, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche descremada en polvo 4%, tween 20 0.1% (v/v) en PBS 1x) por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, por toda la noche a 4 °C, en movimiento. Luego de la incubación con este anticuerpo la membrana fue lavada tres veces con solución de bloqueo por 10 min cada vez a temperatura ambiente y con agitación constante, posteriormente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (diluido en solución de bloqueo). Concluida la incubación con el anticuerpo secundario la membrana fue lavada tres veces con solución de bloqueo por 10 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Las membranas que fueron incubadas con anticuerpo secundario acoplado a HRP se revelaron por quimioluminiscencia con los sustratos Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se expusieron a placas fotográficas. Las membranas que fueron incubadas con anticuerpo secundario acoplado a ^{125}I se revelaron exponiéndolas a una pantalla tipo K por toda una noche y luego se registró la imagen en el equipo Molecular Imagen FX.

Ensayo de activación de la fosforilación de ERK

Las células se transfectaron con lipofectamina y reactivo plus, permitiendo la expresión de los receptores por 48 hrs. Luego las células se incubaron en presencia o ausencia de Baclofen 100 μM por toda la noche. Para realizar el ensayo de activación se eliminó el medio de cultivo de las células y se lavó la placa una vez con PBS 1x. Se adicionó DMEM sin suplementar o suplementado en el control positivo de activación. Luego se incubó con baclofen 100 μM el tiempo establecido para cada condición, excepto a los controles negativo y positivo. Concluido este paso se extrajo el medio y se agregaron 100 μl de tampón de carga 3x para recolectar luego en tubo de 1,5 ml. Luego se calentó llevó el tubo tapado a 100 °C por 3 min Finalmente se cargó la muestra en un gel de poli-acrilamida o se guardó a -20 °C.

Recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueamiento (FRAP)

Las células se encontraban adheridas a un cubreobjeto tratado con poli-L-lisina y transfectadas con la(s) respectivas construcciones a estudiar. El cubreobjeto se montó en una cámara para microscopía confocal y se le adicionó solución Tyrode (NaCl 124 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 30 mM, Hepes pH 7.4 25 mM) (Harata et al., 2001), manteniendo las células en esta solución durante todo el experimento. Utilizando el láser de 488 nm del microscopio confocal se captó la imagen de una célula que expresaba la construcción transfectada previamente. En esta se seleccionó una región, la cual fue fotoblanqueada por 10 seg con el láser al 100%. Luego se disminuyó la intensidad del láser a 5% y se captaron imágenes secuenciales cada 8 seg y se obtuvo una película de 40 imágenes. El análisis de los datos se realizó escogiendo una región situada a 0.5 μ m del borde interior de la región fotoblanqueada (región analizada) para cuantificar la recuperación de la fluorescencia utilizando el software Image J. Se realizaron dos tipos de análisis que varían en la forma de obtener un valor máximo de fluorescencia al cual se le asigna el 100%. Un análisis considera como 100% el valor máximo obtenido de la fluorescencia de la región analizada (ver Resultados fig. 13b), mientras que el otro análisis asigna el porcentaje máximo a la fluorescencia de la región estudiada de la foto control.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de las biotinizaciones se realizaron en el programa Quantity One. Los datos son presentados como promedio \pm error estándar de la media. La significancia estadística fue evaluada usando la prueba t-student para comparar dos muestras. Se consideró de significancia estadística cuando $p < 0.05$. La semicuantificación de los ensayos de activación de ERK fosforilada, se realizó con el programa Quantity One utilizando placas fotográficas escaneadas.

Para los experimentos de FRAP las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se analizaron en el programa Image J. Los datos de los experimentos de FRAP son presentados como promedio \pm error estándar de la media. En estos experimentos la significancia estadística se evaluó usando la prueba t-studente utilizando el software Microsoft Excel. Se consideró como significancia estadística cuando $p < 0.05$. Las curvas de los gráficos de puntos se ajustaron a una gráfica asintótica exponencial utilizando el programa Origin 7.0.

4. Resultados

4.1 Los extremos C-terminal del receptor GABA_B no están implicados en la estabilidad de éste en la superficie celular luego del tratamiento crónico con agonista.

4.1.1 Permanencia de receptores GABA_B nativos en la membrana plasmática de células COS-7 luego del tratamiento crónico con el agonista Baclofen.

Como primer objetivo de esta tesis nos propusimos continuar con la investigación del comportamiento del receptor GABA_B inserto en la membrana plasmática frente al tratamiento crónico con agonista.

El receptor GABA_B presenta particularidades que lo hacen diferenciarse de los demás GPCRs, como la fosforilación del dominio intracelular de GABA_BR2 (R2) que estabiliza al receptor en la membrana celular de neuronas hipocámpales (Couve et al., 2002) y además la permanencia invariable de un *pool* de GABA_BR1 (R1) en la superficie celular de neuronas corticales hasta las 24 hrs de incubación con baclofen (100 µM) (Fairfax et al., 2004).

Para cumplir con este objetivo realizamos el estudio de receptores GABA_B expuestos a tratamiento crónico (12 hrs) con baclofen, expresados en la línea celular COS-7. Las células se electroporaron con construcciones plasmidiales de las subunidades del receptor R1 con epítipo c-myc, llamada AC5-Gbm y R2 con epítipo HA, llamada GABA_BR2-HA (Couve et al., 1998). Estas subunidades fueron detectadas por inmunofluorescencia para verificar su correcta expresión y distribución celular. La obtención de imágenes de microscopía confocal confirma una distribución reticular para R1 (Fig. 4a) y una distribución de membrana plasmática de R2 (Fig. 4b), patrones ya descritos para estas proteínas (Couve et al., 1998).

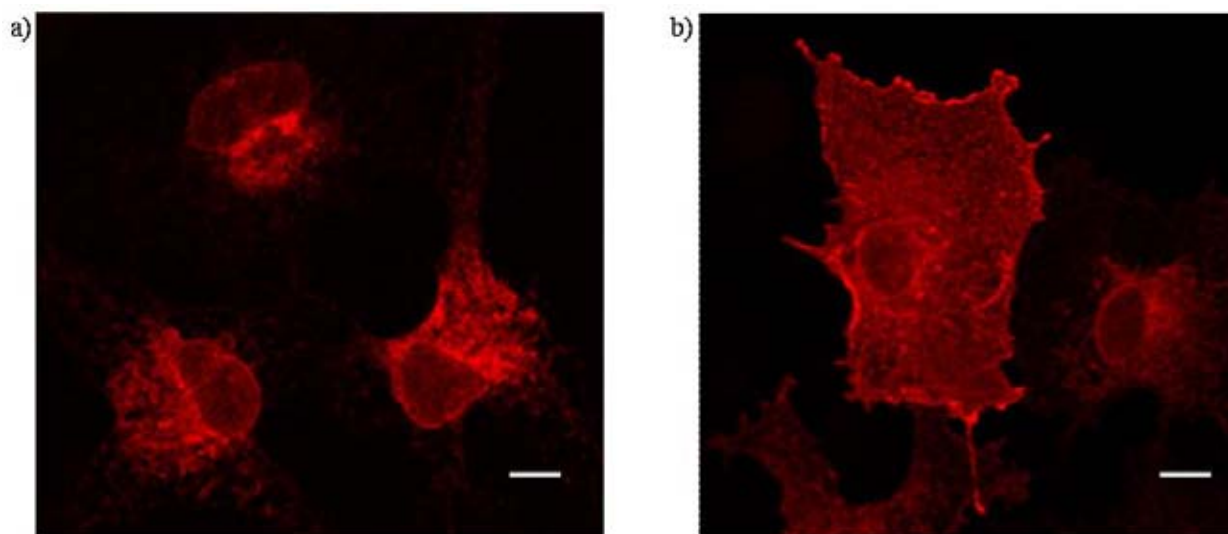


Figura 4. **Inmunofluorescencia de subunidades recombinantes del receptor GABA_B en células COS-7.** Las células fueron electroporadas con R1 o R2 y luego de 48 hrs. postransfección se realizó la inmunodetección. a) La proteína intracelular R1 fue detectada luego de permeabilizar las células, con el anticuerpo anti-c-myc y anti-mouse Alexa 546 como anticuerpo secundario. b) La proteína de superficie R2 fue detectada en células intactas, con el anticuerpo anti-HA y anti-mouse Alexa 546 como anticuerpo secundario. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. La escala de barra corresponde a 10 μ m.

Para estudiar los receptores presentes en la membrana celular se utilizó la técnica de biotinylation de proteínas de superficie, la cual permite separar selectivamente las proteínas de la superficie celular de las presentes intracelularmente, esto por enlaces de amida que forman las moléculas de biotina con los grupos amino libres de los aminoácidos de lisina expuestos hacia el espacio extracelular por las proteínas. Las proteínas biotiniladas fueron posteriormente precipitadas mediante unión a estreptavidina y analizadas por Western blot detectando la subunidad R2. Esta subunidad se encuentra presente tanto en la fracción de proteínas biotiniladas (Fig. 5a, carriles 1, 3, 6 y 8) como en la fracción de proteínas totales (Fig. 5a, carriles 2, 4, 7 y 9). En esta última fracción la banda esperada (116 KDa) es de menor peso molecular, lo cual se puede atribuir a la ausencia de modificaciones postraduccionales de un porcentaje importante de la proteína total celular.

El *pool* de receptores GABA_B, evidenciado por la presencia de la subunidad R2, en la superficie celular de células COS-7 no varía luego de 12 hrs de tratamiento con el agonista baclofen (ver fig. 5). La presencia de un número constante de receptores en la membrana plasmática tanto de las células no tratadas con el agonista (Fig. 5a carril 1) con las células expuestas a tratamiento crónico con baclofen 100 μ M por 12 hrs (Fig. 5a carril 3), reproduce los resultados obtenidos en neuronas en los cuales se inmunodetectó R1 (Couve et al., 1998). De igual modo R2 (en ausencia de R1) no presenta diferencia en la cantidad de la subunidad en la superficie celular entre células con y sin tratamiento con baclofen (Fig.5a carriles 6 y 8, respectivamente). El análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre la abundancia en membrana plasmática del receptor GABA_B en ausencia o luego de 12 h de tratamiento con agonista (Fig 5b). Los leves aumentos observados en presencia de agonista

pueden considerarse errores de medición, pues la subunidad R2, que no es sensible agonista se comporta de la misma manera (Fig. 5b).

Por lo tanto podemos concluir que los receptores GABA_B permanecen en la membrana celular de células COS-7 en un *pool* invariable luego de tratamiento crónico con agonista.

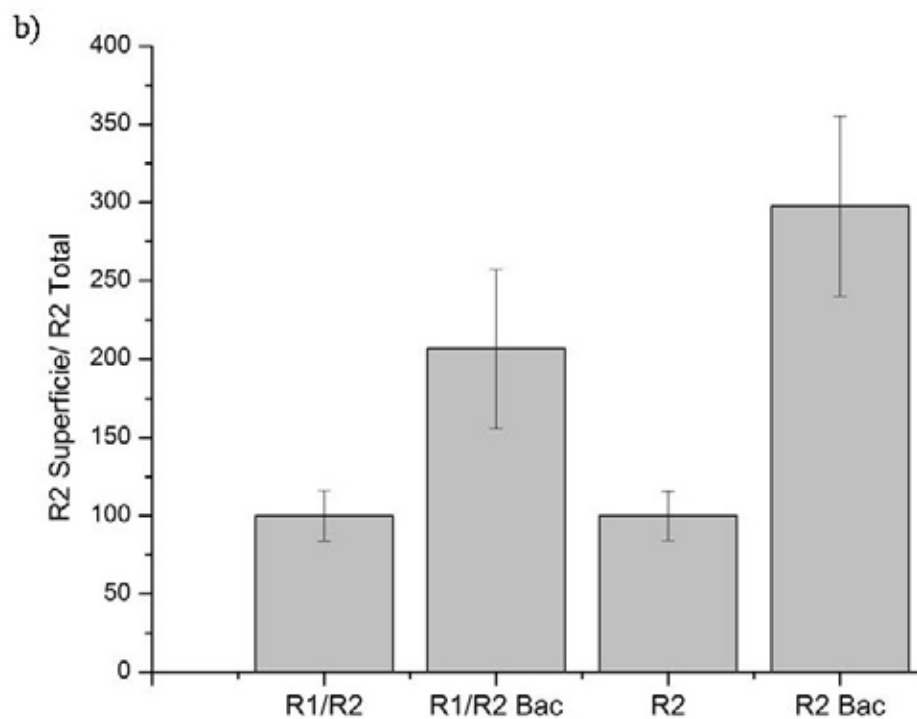
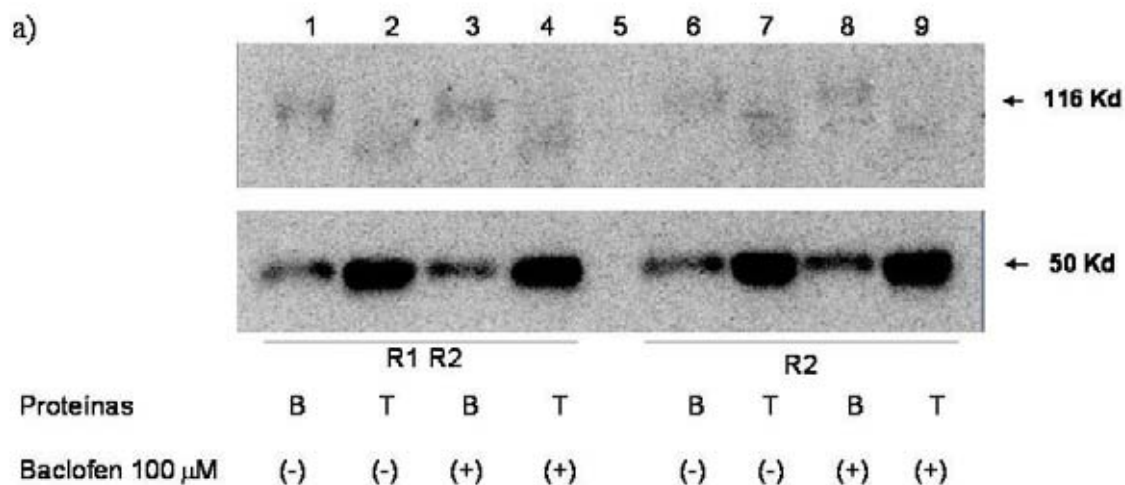


Figura 5. **Biotinilización de receptores de superficie GABA_B en células COS-7 después de tratamiento crónico con agonista.** a). Immunodetección por Western blot de la subunidad R2 de células electroporadas con R1/R2 (4:1) o solo con R2. Las células fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de 100 μ M de baclofen, por 12 hrs. La proporción de receptores remanentes en

la superficie celular fue determinada por ensayos de biotinización. En los cuales se obtuvieron fracciones de proteínas biotiniladas (B) y totales (T), que fueron inmunodetectadas con anti-HA y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a I¹²⁵. Se realizó Western blot para detectar tubulina como control de carga. Los inmunoblots fueron expuestos al Molecular Imager FX. b). Cuantificación de Western blot de R2 (n° = 4) utilizando el software Quantity One, normalizando R2 biotiniladas contra R2 total. La significancia de las diferencias entre las barras fue calculada mediante el test de student: T-test R1R2 = 0,289, T-test R2 = 0,141 (P<0,05).

4.1.2 Permanencia de receptores GABA_B delecionados del extremo carboxilo terminal en la membrana plasmática de células COS-7 luego del tratamiento crónico con el agonista.

Debido a la estabilidad evidenciada del receptor en la membrana celular de células COS-7 quisimos establecer la participación de las regiones carboxilo terminal del receptor GABA_B en este fenómeno. Para lo cual realizamos biotinizaciones de células COS-7 transfectadas con R1ΔC con epítotope c-myc, llamada pRK5R1a-C y R2ΔC con epítotope HA, llamada GABA_BR2-ctail-HA, dos construcciones plasmidiales de las subunidades del receptor con extremos C-terminal delecionados (Calver et al., 2001). Los patrones de expresión de estas construcciones resultaron ser de membrana, tal como estaba descrito (Calver et al., 2001). Esto se debe a que R2 nativo se inserta en la membrana por si solo y R1 nativo presenta una secuencia de retención reticular que esta ausente en la construcción R1ΔC pudiendo insertarse en la membrana celular aún en ausencia de R2 (Fig. 6).

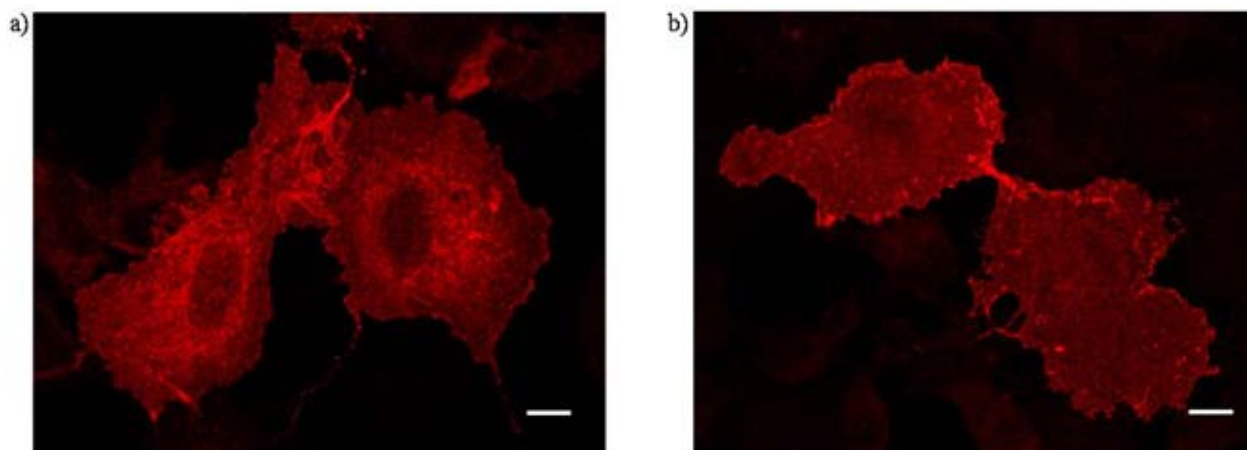


Figura 6. **Inmunofluorescencia de subunidades recombinantes del receptor $GABA_B$ delecionadas de su extremo C-terminal en células COS-7.** Las células fueron electroporadas con R1 Δ C o R2 Δ C, luego de 24 hrs. postransfección se realizó inmunodetección. Inmunofluorescencia de R1 Δ C (imagen derecha) y R2 Δ C (imagen izquierda) detectada en células intactas con los anticuerpos anti-c-myc (R1 Δ C) y anti-HA (R2 Δ C), como anticuerpo secundario se utilizó anti-mouse Alexa 546. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía confocal. de barra corresponde a 10 μ m.

Las biotinizaciones muestran la presencia de R2ΔC tanto en la fracción de proteínas biotiniladas (Fig. 7a, carriles 1, 3, 6 y 8) como en la fracción de proteínas totales (Fig. 7a, carriles 2, 4, 7 y 9). Al cuantificar los Western blot podemos ver que R2ΔC no varía al incubarse con baclofen por 12 hrs, ya que no existen diferencias significativas entre el número de receptores sin y con tratamiento con baclofen (100 μM) por 12 hrs (Fig. 7b). Lo mismo ocurre al comparar la cantidad de receptores de superficie de células electroporadas solo con R2ΔC (Fig. 7a carriles 6-9). Estos resultados sugieren que los dominios C-terminal del receptor GABA_B no participan en el mantenimiento de un *pool* estable de este receptor en la membrana plasmática de células COS-7.

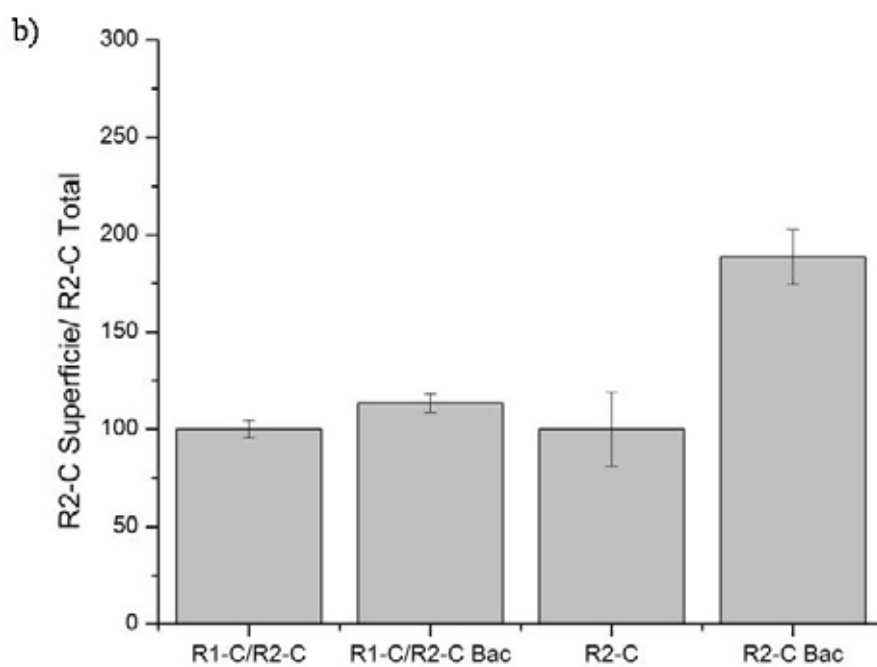
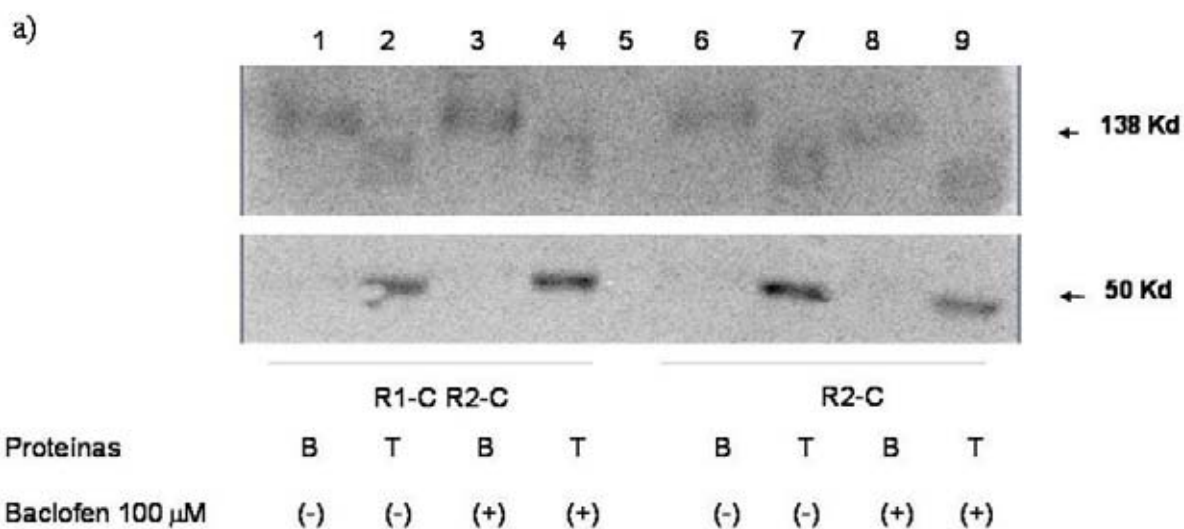


Figura 7. Biotinilización de receptores de superficie GABA_B delecionadas de su extremo C-terminal en células COS-7 después de tratamiento crónico con agonista. a). Immunodetección por Western blot de la subunidad R2 Δ C de células electroporadas con R1 Δ C/R2 Δ C (4:1) o solo

con R2ΔC. Las células fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de 100 μM de baclofen, por 12 hrs. La proporción de receptores remanentes en la superficie celular fue determinada por ensayos de biotinilización. En los cuales se obtuvieron fracciones de proteínas biotiniladas (B) y totales (T), las que fueron inmunodetectadas con anti-HA y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a I¹²⁵. Se realizó Western blot de tubulina como control de carga. Los inmunoblots fueron expuestos al Molecular Imager FX. B. Cuantificación de Western blot de R2ΔC (n = 4) utilizando el software Quantity One, normalizando R2 biotiniladas contra R2 total. La significancia de las diferencias entre las barras fue calculada mediante el test de student: T-test R1ΔC/R2ΔC = 0,353, T-test R2ΔC = 0,413 (P<0,05).

4.2 Los receptores GABA_B que permanecen estables en la membrana plasmática se desensibilizan en respuesta agonista.

4.2.1 Los receptores GABA_B estimulan la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a agonista en células HEK293.

Para evaluar la actividad del receptor en presencia crónica de agonista se midió la activación del receptor mediante el ensayo de fosforilación de las proteínas ERK1/2. El acoplamiento del receptor GABA_B a proteína G, desencadena una cascada de señalización intracelular. La activación de la fosforilación de ERK por parte del receptor GABA_B ha sido utilizada para demostrar la funcionalidad de construcciones heterólogas de éste en células HEK293 (Villemure et al., 2005).

Los ensayos de activación realizaron mediante incubaciones de células HEK293, transfectadas con el receptor, a distintos tiempos con el agonista baclofen (100 µM). Los resultados obtenidos evidencian una activación de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 luego de 2 a 10 minutos debido a la actividad de GABA_B en respuesta a baclofen 100 µM (Fig. 8a carriles 2 – 4), acentuándose este efecto a los 5 minutos de incubación con agonista (Fig. 8b). Por tanto podemos decir que el aumento de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 mediado por la actividad del receptor GABA_B agonista-dependiente es una aproximación que permite el estudio de la actividad de éste.

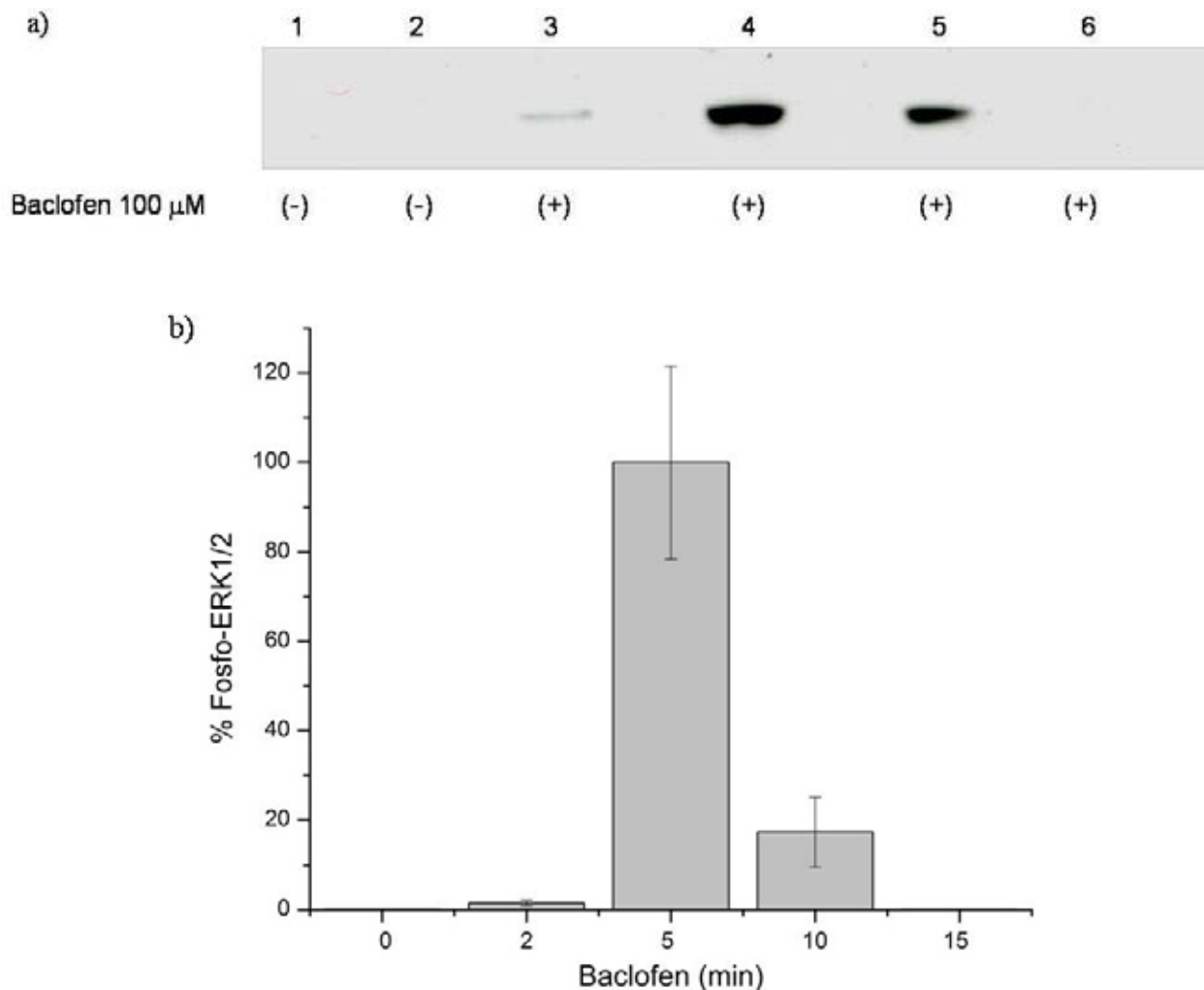


Figura 8. **Activación de la fosforilación de ERK por el receptor GABA_B en respuesta a baclofen.** a) Inmunodetección por Western blot de fosfo-ERK. Células HEK293 fueron mantenidas sin transfectar (carril 1), o transfectadas con R1/R2 (1:4) y luego de 48 hrs. postransfección se incubaron con baclofen 100 μ M por 1, 2, 5, 10 y 15 minutos. La proteína fosforilada fue detectada con anti-fosfo-ERK1/2 y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP, revelándose por quimioluminiscencia. b). Semicuantificación de los Western blot mencionados en a) (n = 3), utilizando el software Quantity One. Se aplicó el análisis estadístico test de student: 0 – 2 min. = 0,4, 2 – 5 min. = 0,151, 5 – 10 min. = 0,238, 10-15 min. = 0,417 (P<0,05).

4.2.2 Desensibilización de GABA_B en respuesta al tratamiento crónico con Baclofen en células HEK293.

De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos en esta tesis, la permanencia de un número constante de receptores GABA_B en la superficie celular es un fenómeno agonista–independiente frente a tratamientos crónicos, que no se ve afectado por la ausencia de los extremos amino terminal del receptor. Esto nos lleva a cuestionarnos si luego de esta estimulación crónica con agonista, los receptores de todas formas experimentan desensibilización, permaneciendo en la membrana celular con un cierto grado de inactividad. Es decir si los receptores estables en la membrana permanecen activos o corresponden a receptores inactivados en vías de degradación lenta.

Intentando responder esta interrogante se ha publicado la desensibilización agonista–dependiente del receptor GABA_B en células CHO-K1, estudiando la inhibición de la actividad de adenilato ciclasa, y la internalización de éste luego de 2 hrs. de tratamiento con agonista (González-Maeso et al., 2003), pero la imposibilidad de reproducir estos resultados en neuronas hace de estos datos poco confiables.

Para evaluar la existencia de desensibilización por exposición crónica a agonista de los receptores GABA_B realizamos ensayos de desensibilización de doble pulso. Los que consistieron en tratar células HEK293 transfectadas con el receptor con un primer pulso de activación crónico con agonista por 12 hrs, luego del cual las células se lavaron eliminando el baclofen para dar un segundo pulso agudo de agonista de 5 min (Fig. 9a, carril 4). En caso de existir una desensibilización el segundo pulso de agonista debería producir una activación de los receptores pretratados con agonista significativamente menor que la activación de receptores que no tuvieron contacto previo con agonista. Estos receptores evidenciaron una activación de la

fosforilación de ERK1/2 menor a la alcanzada por receptores tratados solo con el pulso agudo de agonista de 5 min (Fig. 9a, carril 3). Sin embargo al analizar estadísticamente los resultados, las diferencias de aumento de la fosforilación de ERK1/2 por parte de los receptores tratados con dos pulsos o solo uno de agonista, no permiten establecer que los receptores experimentan una desensibilización en respuesta a tratamientos crónicos con baclofen. Estos resultados sólo sugieren una desensibilización agonista-dependiente de los receptores GABA_B en respuesta a tratamientos crónicos en células HEK293. Por lo tanto los receptores GABA_B que permanecen estables en la membrana plasmática sufrirían desensibilización agonista-dependiente frente a tratamiento crónico.

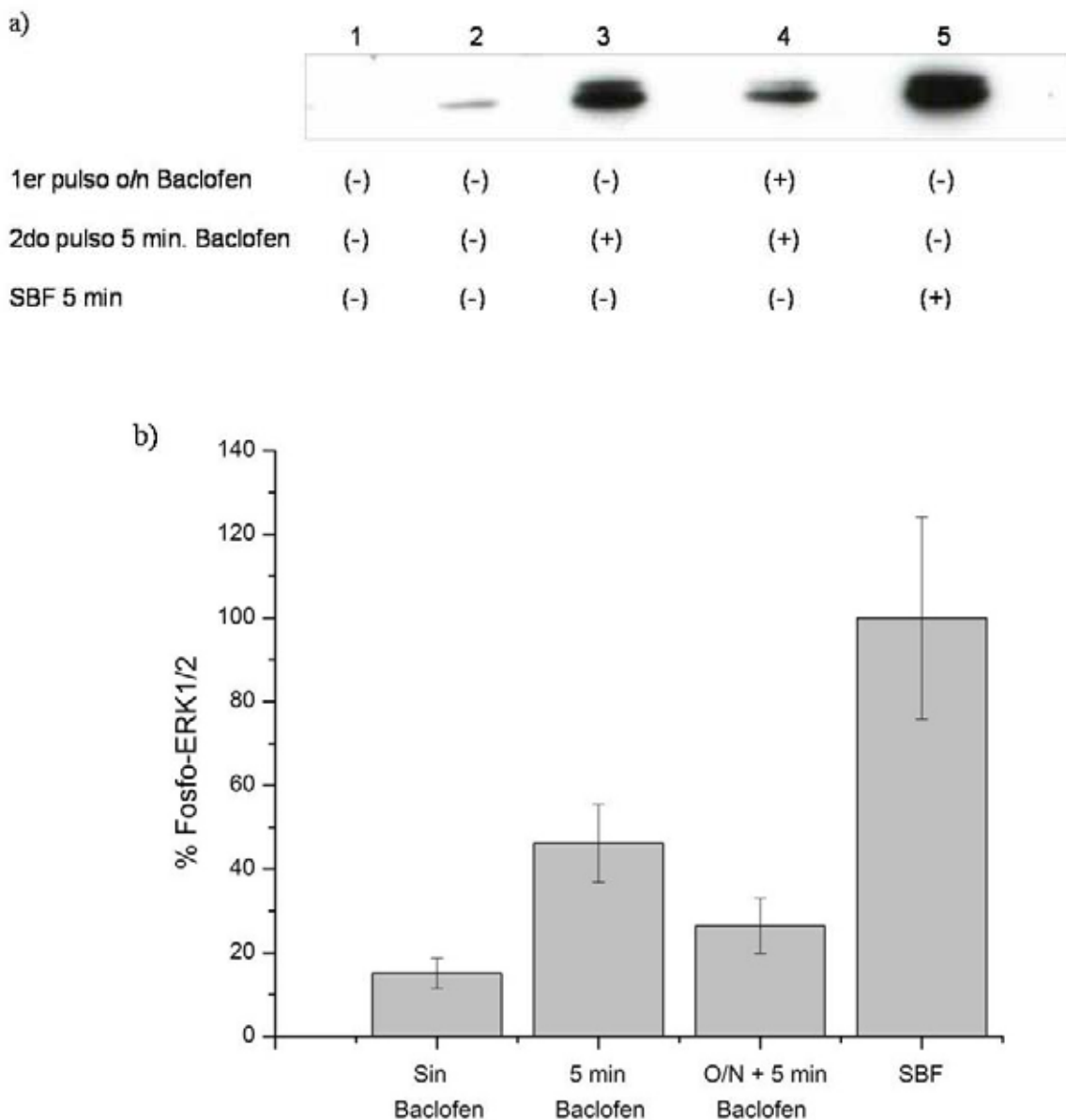


Figura 9. **Activación de la fosforilación de ERK por GABA_B debido a tratamiento crónico con baclofen** a). Inmunodetección por Western blot de fosfo-ERK1/2. Células HEK293 fueron transfectadas o no (carril 1), con R1/R2 (1:4) y luego de 48 hrs. postransfección se incubaron con un primero pulso de baclofen 100 μ M por toda la noche (12 hrs.) y se reincubaron con un segundo pulso de 5 min. (carril 4) o solo se les aplicó el segundo pulso (carril 3). Como control negativo se incubaron células solo con medio de cultivo (carril 2) y como positivo se incubaron

células con SBF (carril 4), este último para tener una activación inespecífica de la fosforilación de ERKs. Las proteínas fosforiladas se detectaron con anti-fosfo-ERK1/2 y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP, revelándose por quimioluminiscencia. b). Semicuantificación de los Western blot mencionados en a) ($n = 3$), utilizando el software Quantity One. Se aplicó el análisis estadístico test de student: 0 – 5 min. = 0,423, 5 – o/n+5 min. = 0,625, o/n+5 min. – SBF = 0,239. ($P < 0,05$).

4.3 El extremo carboxilo terminal de GABA_BR2 participa en la restricción de los movimientos laterales del receptor GABA_B en la membrana de células HEK293.

Las superficies sinápticas presentan receptores en regiones bien definidas (Lujan et al., 2004). Los receptores de glutamato se ubican en el centro de estas superficies y se ha descrito que experimentan una movilidad en membrana celular de neuronas que les permite moverse dentro o fuera de espinas, dependiendo de la actividad neuronal (Sharma et al., 2006).

El receptor GABA_B en neuronas se ubica perisinápticamente (Lujan 2006), pero no se sabe si este llega a estas regiones en vesículas (que formarán parte de la membrana celular una vez insertas en esta) o si migra de regiones vecinas. Para que el receptor migre de una región a otra en la membrana celular es necesario que presente un grado de movilidad. Para determinar si el receptor GABA_B es móvil en la membrana celular y si esta característica se ve afectada por la ausencia del dominio intracelular de R2, realizamos estudios de movilidad utilizando una proteína de fusión fluorescente de la subunidad R2 del receptor.

4.3.1 La subunidad GABA_BR2 es móvil en la superficie celular de células HEK293

Para estudiar la movilidad del receptor GABA_B se utilizó la proteína de fusión GABA_BR2-GFP (R2-GFP, ver fig. 10a). Para determinar la integridad y funcionalidad de nuestra construcción, R2-GFP se cotransfectó con R1 en células COS-7.

Mediante inmunofluorescencia se puede observar una colocalización de R1 y R2-GFP en la membrana celular (Fig. 10b, merge panel superior), lo cual indica que la construcción R2-GFP es capaz de reproducir una función esencial de esta subunidad que es rescatar a R1 del retículo (Fig. 10b, recuadro en panel inferior) para llegar como heterodímero a la superficie celular, propiedad que también presenta la proteína de fusión R2 con epítipo HA

que no es fluorescente (Fig. 10b, panel inferior). Por tanto la subunidad R2-GFP conserva las propiedades de la subunidad R2 nativa ya que es capaz de heterodimerisar con R1.

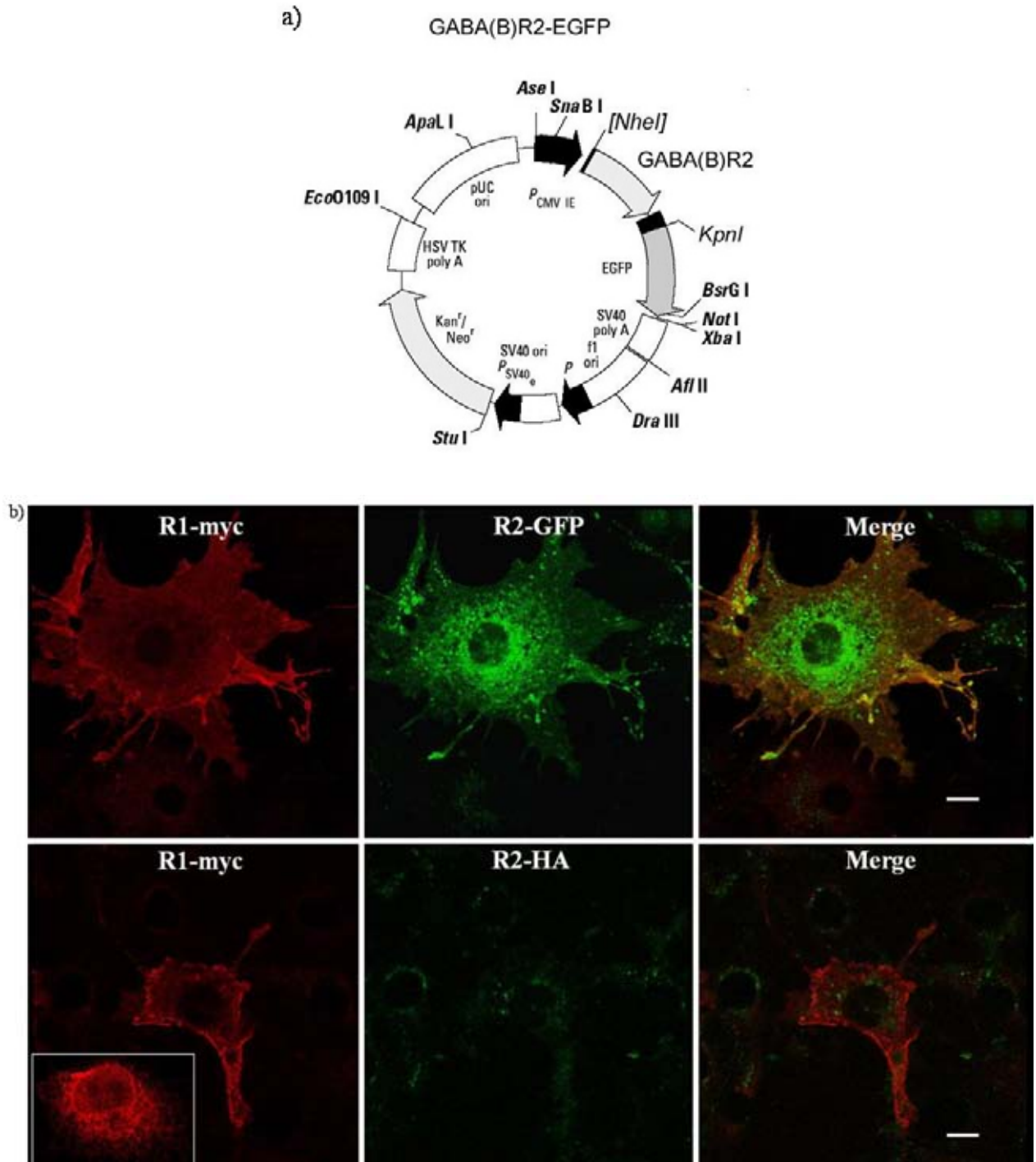


Figura 10. **Expresión funcional de GABA_BR2-GFP en células COS-7.** a) Mapa plasmidial de la construcción GABA_BR2-GFP. b) Inmunofluorescencia detectando R1. Las células fueron cotransfectadas con R1/R2-GFP o R1/R2-HA (4:1, en ambos casos), luego de 48 postransfección

se realizó la inmunodetección en células intactas o permeabilizadas de R1 con los anticuerpos anti-c-myc y anti-mouse Alexa 546 como anticuerpo secundario. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía confocal con láser a 488 y 543 nm, para detectar R2-GFP y R1 respectivamente. En el panel superior se muestran células cotransfectas con R1/R2-GFP y su correspondiente colocalización (merge), en el panel inferior se muestra como control positivo una célula cotransfectada con R1/R2-HA. La escala de barra corresponde a 10 μm .

Para el estudio de la movilidad del receptor realizaremos ensayos de Recuperación de la Fluorescencia después del Fotoblanqueamiento (FRAP). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para estudiar difusión de proteínas, unión/disociación y procesos de transporte (Sharma et al., 2006, Fortín et al., 2005). Este análisis se realiza utilizando microscopía confocal y consiste en seleccionar una región de interés en una célula, que expresa una molécula fluorescente (en nuestro caso la proteína fluorescente verde (GFP)), y fotoblanquear ésta con un láser de alta intensidad. Luego de un período variable de tiempo se observa recuperación de la fluorescencia, debido al movimiento de las moléculas fluorescentes cercanas a la región fotoblanqueada, y se registran imágenes en intervalos de tiempo con láser de baja intensidad (Fig. 11a). Los ensayos de FRAP permiten monitorear la movilidad de una proteína celular en distintos intervalos de tiempos. Se asume que GFP luego de ser excitada a su estado máximo de emisión no recupera su fluorescencia y que el experimento se realiza en períodos de tiempo donde la síntesis de nueva proteína fluorescente es insignificante

Las bases teóricas de un ensayo de FRAP nos permiten graficar el comportamiento de la proteína estudiada (Fig. 12b), fusionada con una molécula fluorescente, reconociendo en este los siguientes parámetros:

- fluorescencia total (FT): es la fluorescencia que presenta la región analizada antes del fotoblanqueamiento.
- fluorescencia máxima teórica de recuperación (FMT): es la fluorescencia total menos la perdida por el fotoblanqueamiento (blanqueamiento más redistribución en el área).
- fluorescencia de recuperación máxima empírica (FME): es la fluorescencia que se obtiene debido a la recuperación de la región fotoblanqueada.

La gráfica define *pools* de proteína,

- 1) *pool* de proteínas móviles: que dan origen a la FME
- 2) *pool* de proteínas inmóvil: es la diferencia entre la FMT y FME.

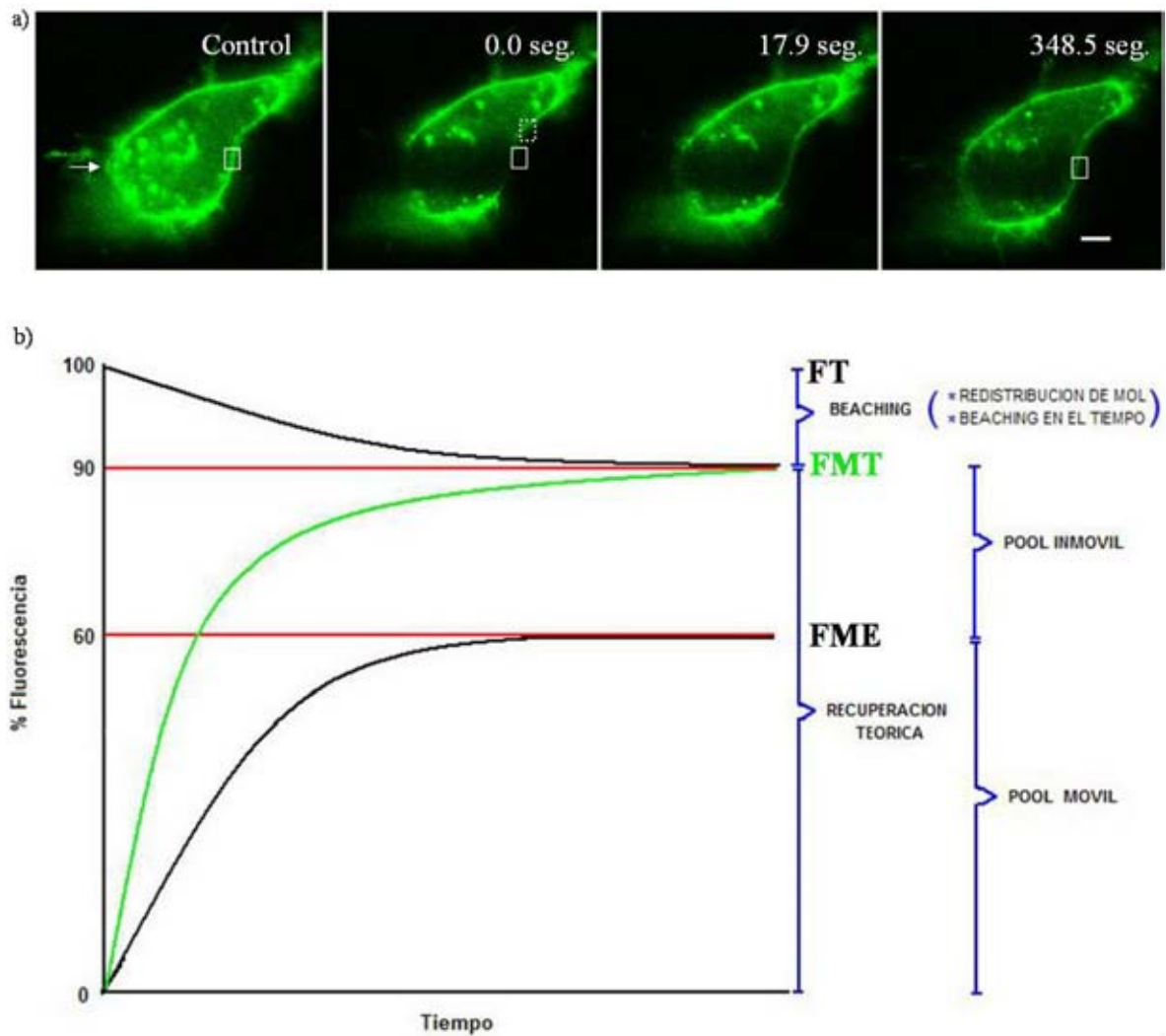


Figura 11. **Ensayo de Recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueamiento (FRAP).** a) Gráfico de curvas de FRAP. La recuperación empírica obtenida de los ensayos corresponde al *pool* móvil de la proteína estudiada b) Células HEK293 fueron transfectadas con R2-GFP y luego de 48 hrs postransfección se obtuvo la imagen de una célula positiva para R2-GFP y se le realizó FRAP. La flecha indica la zona fotoblanqueada. Los recuadros en las imágenes indican: control = fluorescencia máxima teórica, 0 seg. línea continua = región analizada y línea discontinua = región no fotoblanqueada con una fluorescencia inicial equivalente a la región analizada, 348,5 seg. = fluorescencia máxima empírica (dependiente de la distribución de área de la proteína fluorescente). La escala de barra corresponde a 10 μ m.

Con el objetivo de reconocer en la técnica de FRAP una herramienta que nos permita estudiar el movimiento proteínas en membranas celulares, decidimos realizar ensayos de FRAP en células HEK293 transfectadas con las proteínas EGFP (proteína soluble de libre difusión) y GAP43-GFP (proteína miristoilada que se asocia a membrana celular).

Los gráficos obtenidos al analizar los resultados de los FRAPs muestran que la FME de EGFP y GAP43-GFP (Fig. 12a y c) difieren significativamente, sugiriendo la existencia de un *pool* inmóvil (ver fig. 11) mayor para GAP43-GFP que corresponde al 50% de la fluorescencia inicial de la región analizada, mientras que EGFP presenta una FME que representa cerca del 100% de la FMT evidenciando que la totalidad de la proteína es móvil. Además la diferencia en la cinética de recuperación de la FME (Fig. 12b) da cuenta de una temprana saturación de EGFP y una menor velocidad de los movimientos de GAP43-GFP, consistente con la asociación a membrana que presenta esta proteína. Estos resultados confirman que los ensayos de FRAP permiten diferenciar tanto por cinética, como por porcentaje de recuperación de fluorescencia proteínas solubles de asociadas en la membrana celular de células HEK293. Además demuestran que durante el ensayo distintas proteínas se comportan de manera diferente, lo cual muestra la especificidad de los ensayos de FRAP.

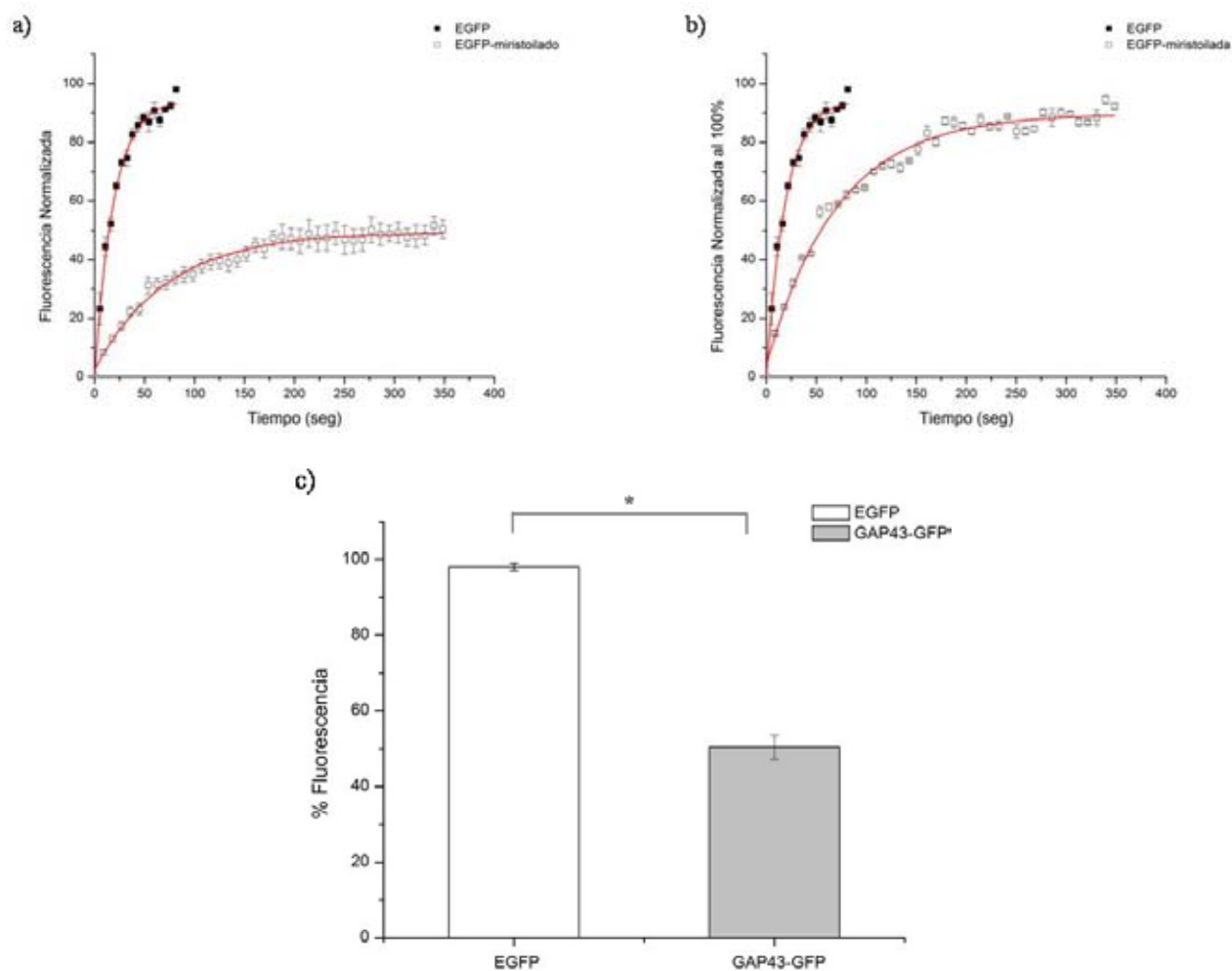


Figura 12. Recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueamiento (FRAP) de las proteínas EGFP y GAP43-GFP expresadas en células HEK293. Las células fueron transfectadas con EGFP o GAP43-GFP y luego de 48 hrs. postransfección se obtuvo la imagen de una célula positiva para EGFP o GAP43-GFP y se le realizó FRAP. Cuantificación del porcentaje de fluorescencia recuperada en una región fotoblanqueada, analizada utilizando el software

Image J. a) Los datos se normalizaron con la fluorescencia de la región analizada de la imagen control. b) Los datos se normalizaron asignando el valor de 100% al mayor valor de la fluorescencia recuperada. c) Fluorescencia máxima empírica de las proteínas EGFP y GAP43-GFP. * $P < 0.05$, t-test = 0,011, $n^{\circ} = 3$ por columna.

Para conocer el comportamiento de R2-GFP en membrana celular realizamos experimentos de FRAP a células HEK293 transfectadas con la subunidad.

Al analizar la recuperación de la fluorescencia de una célula HEK293 que expresa R2-GFP podemos ver que esta subunidad es móvil en la membrana celular (Fig. 13). Además las curvas de recuperación y pérdida de fluorescencia no se intersectan, lo que da cuenta de la existencia de un *pool* inmóvil de R2-GFP. Por tanto R2-GFP presenta una fracción de proteínas que experimentan movimientos laterales en la superficie celular de células HEK293.

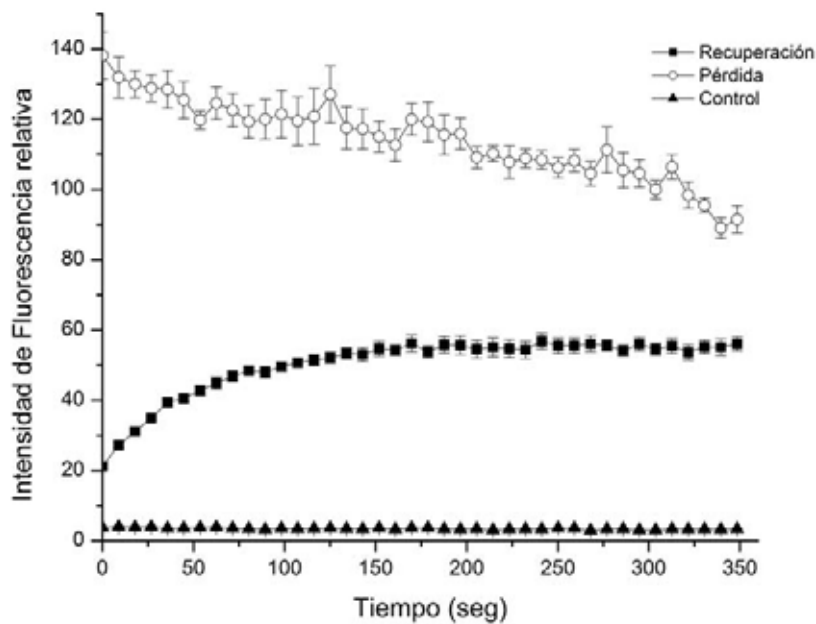


Figura 13. **FRAP de R2-GFP en células HEK.** Las células fueron transfectadas con R2-GFP, luego de 48 hrs. postransfección se obtuvo la imagen de una célula positiva para R2-GFP y se le realizó FRAP. El gráfico de las curvas de FME (rombos azules) y FMT (cuadros fucsias). Como control se analizó una región extracelular (círculos naranjas). Los valores fueron normalizados asignando un valor de 100% a la fluorescencia de la célula control (imagen tomada antes del fotoblanqueamiento). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal y se analizaron con el software Image J.

Durante los experimentos de FRAP realizados en esta tesis pudimos evidenciar diferencias en la recuperación de la fluorescencia de proteínas presentes en membrana celular y en componentes intracelulares vesiculados (C.V., posiblemente correspondientes a Golgi) (Fig. 14a). Pero el análisis de los FRAPs de células en las cuales esta diferencia era evidente, no pudimos corroborar lo observado. Debido a esto nos pareció importante dar a conocer este fenómeno, para lo cual presentamos las curvas de tendencia de la intensidad de fluorescencia relativa (Fig. 14b). Estas evidencian que la fluorescencia de la membrana celular luego del fotoblanqueamiento se distribuye en forma uniforme, mientras que la fluorescencia del componente vesiculado intracelular luego de 350 seg aún se aprecia deficiencia entre las regiones que se fotoblanquearon o no. Por lo tanto, los ensayos de FRAP permiten también diferenciar la presencia de una proteína en distintos compartimentos membranosos de una célula.

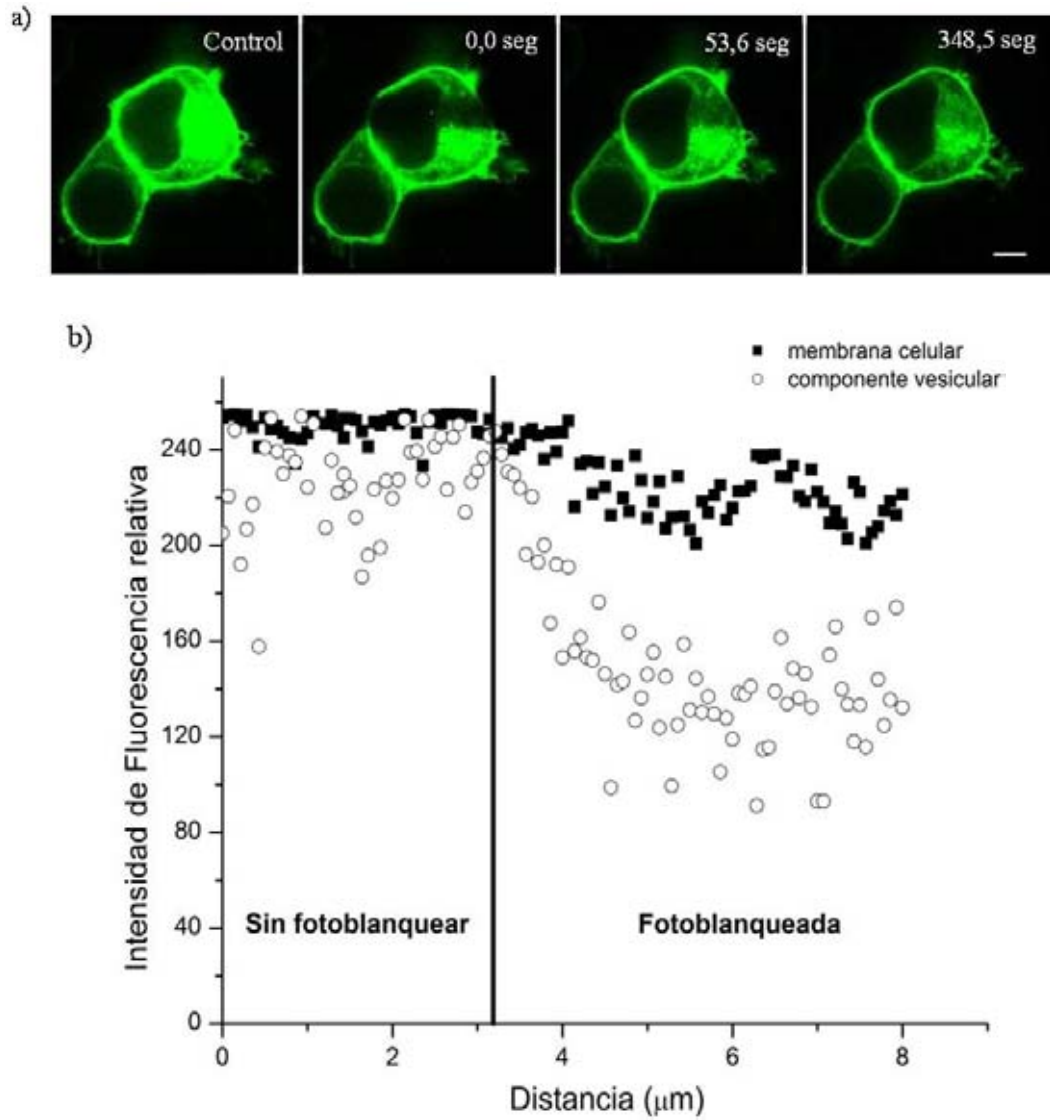


Figura 14. **Recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueamiento (FRAP) de R2-GFP en membranas de células HEK293.** a) Las células fueron transfectadas con R2-GFP, luego de 48 hrs. postransfección se obtuvo la imagen de una célula positiva para R2-GFP y se le realizó FRAP en una región que comprendía membrana celular y componente vesicular. b) Gráfica de la fluorescencia de una región no fotoblanqueada (lado izquierdo) y la continuación de esta que se fotoblanqueó (lado derecho), tanto en la membrana celular como en el C.V., luego de 350 seg del fotoblanqueamiento. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal y se analizaron con el software Image J. La escala de barra corresponde a 10 μm .

4.3.2 *El receptor GABA_B experimenta movimientos laterales en membrana celular de células HEK293*

Para establecer la existencia de receptores GABA_B móviles en membrana celular realizamos estudios del comportamiento del heterodímero mediante FRAP.

Los movimientos laterales que experimentan los receptores una vez emplazados en la membrana celular pueden afectarse por interacciones con otras proteínas o por los dominios de membrana en los cuales se encuentren (Sharma et al., 2006). Esto nos lleva a pensar que el *pool* de receptores GABA_B que permanece en la membrana celular y es susceptible a desensibilización, puede ser suficientemente móvil como para presentar una dinámica de movimientos que les permitan integrarse, insertarse o removerse de dominios de membrana con cierta facilidad.

Para llevar a cabo los estudios se realizaron análisis de FRAP a células HEK293 cotransfectadas con R1/R2-GFP (ver fig. 10b, panel superior). Para la cotransfección se realizó una estandarización de la relación de los DNA plasmidial (pDNA) necesaria para obtener un alto porcentaje de cotransfección, debido a que solo R2 se expresa unida a un epítipo fluorescente (Fig. 15a).

El receptor GABA_B (cotransfección de ambas R1 y R2-GFP) presenta un *pool* móvil de 20% (Fig. 15b). Lo que indica que el receptor GABA_B presenta una movilidad en la membrana celular de células HEK293.

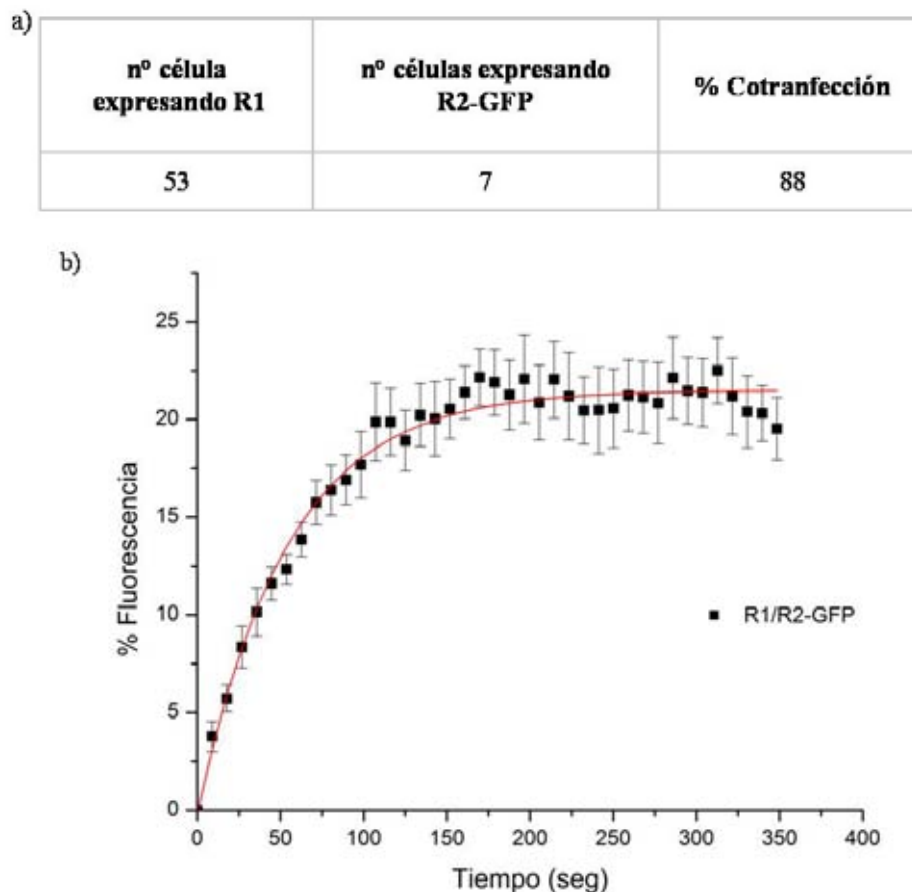


Figura 15. **FRAP del receptor GABA_B (R1/R2-GFP).** a) Estandarización de la relación de pDNA de la cotransfección R1/R2-GFP. Se cotransfectaron células COS-7 con R1/R2-GFP, utilizando una relación de pDNA de 4:1. Se realizó inmunofluorescencia de las células luego de 48 hrs postransfección, detectando R1 con anti-c-myc, como anticuerpo secundario se utilizó anti- mouse Texas Red. Luego se cuantificaron las células que expresaban R1 y R2-GFP mediante microscopía de fluorescencia. El porcentaje expresado corresponde a las células cotransfectadas con R1/R2-GFP. b) Células HEK293 fueron cotransfectadas con R1/R2-GFP (4:1), luego de 48 hrs postransfección se obtuvo la imagen de una célula positiva para R2-GFP y se le realizó FRAP. La cuantificación de la FME de una región se normalizó con la fluorescencia de la imagen control. Los ensayos se realizaron mediante microscopía confocal y utilizando el software Image J. R1/R2-GFP n° = 4.

4.3.3 Participación del extremo C-terminal de la subunidad GABA_BR2 en el movimiento en la membrana plasmática de células HEK293.

Los resultados anteriormente expuestos indican que R2-GFP experimenta movimientos laterales en la membrana celular de células HEK293. Realizamos análisis más exhaustivo de esos ensayos de FRAP para conocer el porcentaje de recuperación de la fluorescencia que tiene R2-GFP, para relacionarlo con la recuperación obtenida al delecionar a la subunidad de su extremo C-terminal.

La importancia del extremo C-terminal de GABA_BR2 en el acoplamiento funcional del receptor heterodimérico esta bien establecida (Couve et al., 2004), pero debido a la orientación citoplasmática del extremo C-terminal de GABA_BR2 es factible atribuirle además un rol en la movilidad del receptor en la membrana celular. Para explorar esta alternativa se realizaron ensayos de FRAP en células HEK293 transfectadas con las construcciones R2-GFP y GABA_BR2ΔC-GFP (R2ΔC-GFP, construcción realizada en nuestro laboratorio a partir del plasmidio GABA_BR2-GFP delecionando el extremo C-terminal de R2). Los resultados evidencian la existencia de un *pool* móvil correspondiente al 30% de fluorescencia total que recupera la subunidad R2-GFP (Fig. 16). Lo que reafirma que la subunidad R2-GFP es móvil en la membrana celular de células HEK293. El porcentaje de recuperación de la fluorescencia de R2-GFP (30%) aumenta a un 45% al delecionar esta proteína de su extremo C-terminal (Fig. 16), siendo esta variación estadísticamente significativa (ver Fig. 16b). Por lo tanto el segmento intracelular de la subunidad R2 del receptor GABA_B participa en la restricción de los movimientos laterales de esta subunidad en la membrana celular de células HEK293.

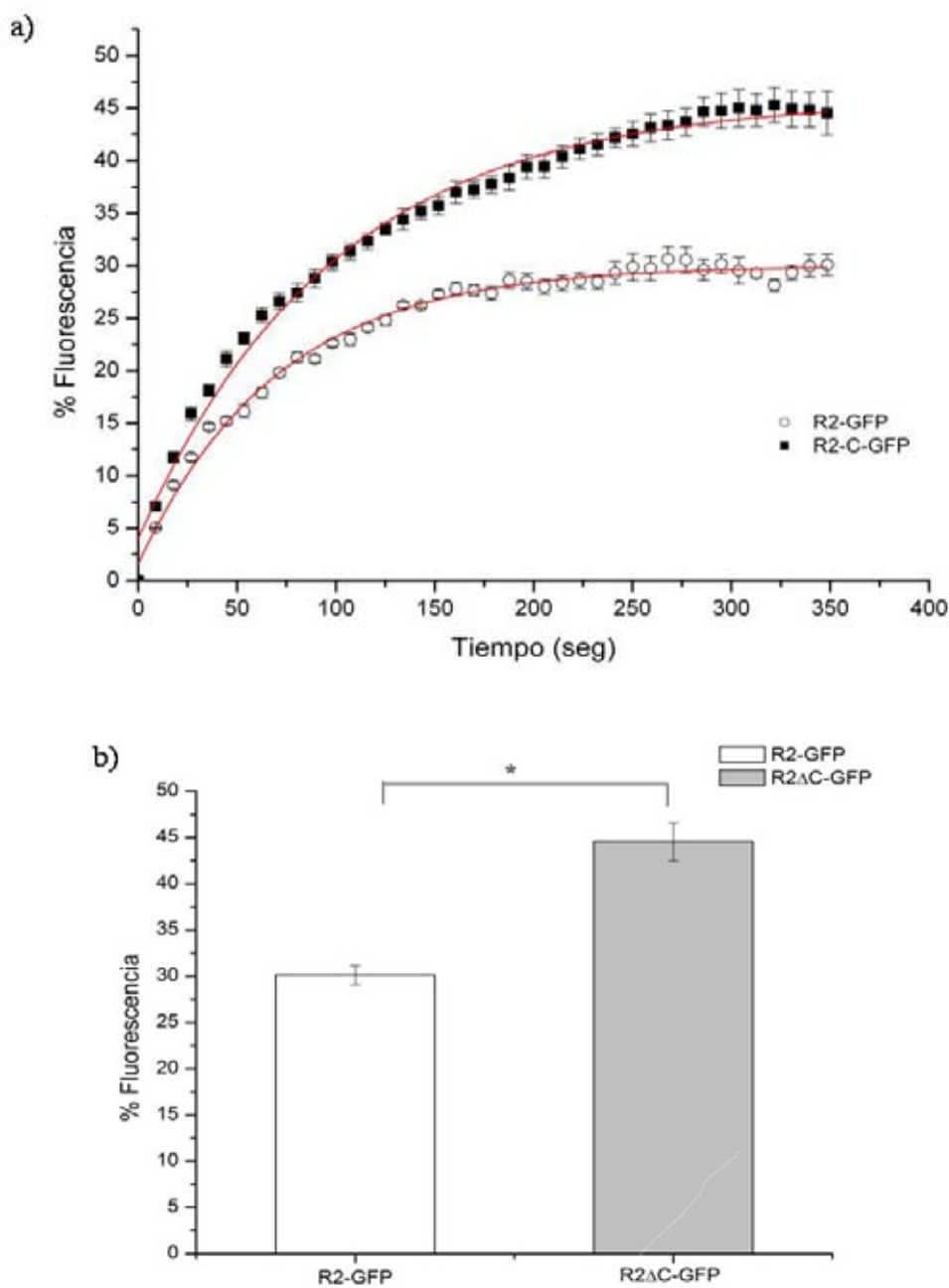


Figura 16. **Recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueamiento (FRAP) de R2-GFP y R2 Δ C-GFP expresados en células HEK293.** Las células fueron transfectadas con R2-GFP y R2 Δ C-GFP, luego de 48 hrs. postransfección se obtuvo la imagen de una célula positiva para R2-GFP o R2 Δ C-GFP y se le realizó FRAP. La cuantificación de la FME de una región se normalizó con la fluorescencia de la imagen control. Los ensayos se realizaron mediante microscopía

confocal y utilizando el software Image J.b) Porcentajes de recuperación máximo empírico de la fluorescencia de R2-GFP y R2 Δ C-GFP. El número de células analizadas por experimento es: R2-GFP n° = 3 y R2 Δ C-GFP n° = 6. t-test: R2-GFP – R2 Δ C-GFP = 0,005. (*P<0,05).

4.3.4 Efecto de la heterodimerización de las subunidades GABA_BR1R2 en el movimiento en la membrana plasmática de células HEK293.

Es importante destacar que la recuperación de la fluorescencia máxima empírica de R1/R2-GFP (Fig. 17) es de 20%, valor que es inferior a la recuperación de R2-GFP de un 30% (Fig. 17). Por lo tanto también podemos decir que la subunidad R1 del receptor contribuye a disminuir el *pool* de receptores móviles en la membrana celular de células HEK293.

En conjunto, los resultados expuestos nos permiten concluir que el receptor GABA_B experimenta movimientos laterales en membrana celular de células HEK293 y que la subunidad R1 produce una restricción de esta movilidad mientras que la delección del extremo C-terminal de R2 resulta en un aumento de la movilidad lateral.

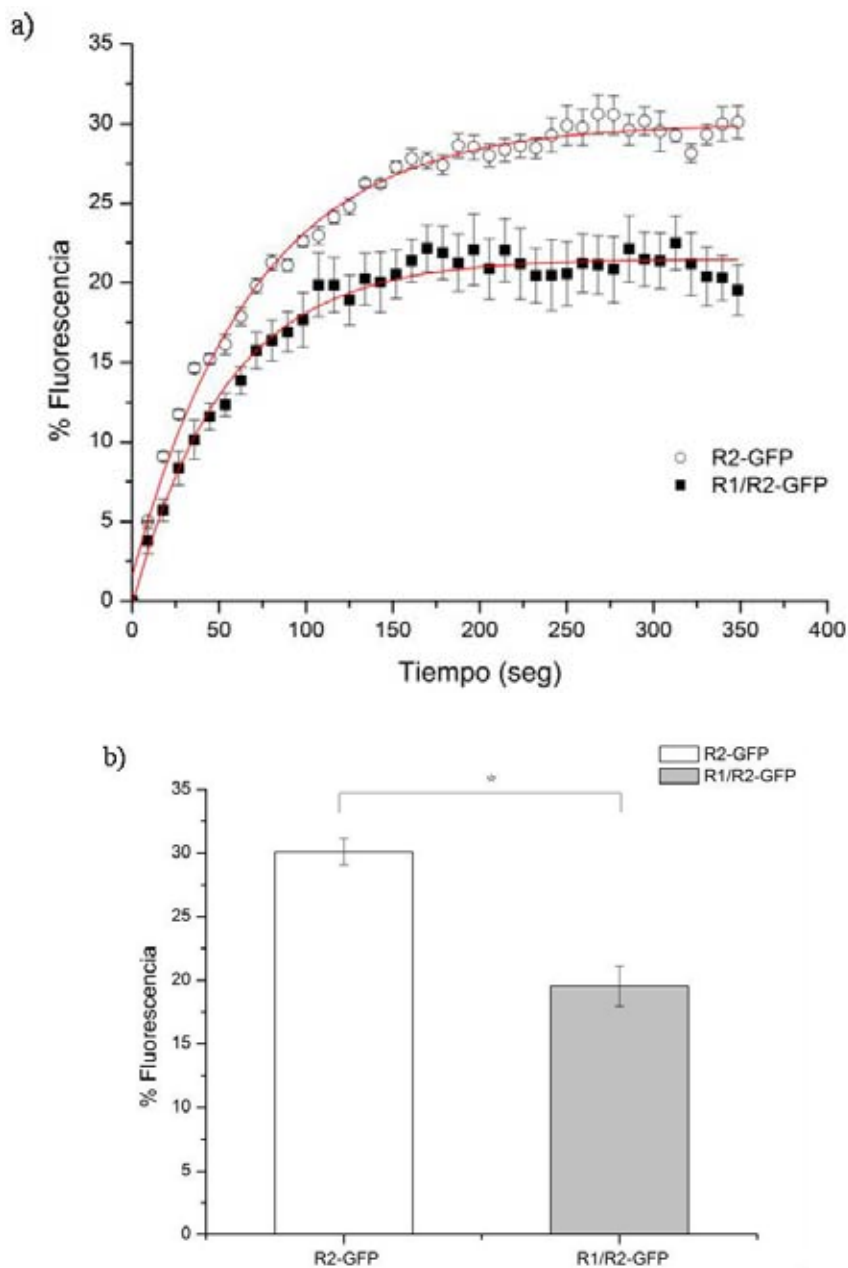


Figura 17. **FRAP del receptor GABA_B (R1/R2) y la subunidad GABA_BR2 en células HEK293.** Las células fueron cotransfectadas con R1/R2-GFP (4:1) o R2-GFP solo, luego de 48 hrs postransfección se obtuvo la imagen de una célula positiva para R2-GFP y se le realizó FRAP. La cuantificación de la FME de una región se normalizó con la fluorescencia de la imagen control. Los ensayos se realizaron mediante microscopía confocal y utilizando el software Image J. R1/R2-GFP n° = 4 y R2-GFP n° = 3. t-test: R2-GFP – R1/R2-GFP = 0,028 (*P <0,05).

4.3.5 *La proteína Mupp-1 no afecta los movimientos laterales de GABA_BR2-GFP en la membrana plasmática de células HEK293.*

Para complementar los estudios de interacción de la proteína Mupp-1 con la subunidad R2 del receptor GABA_B, realizamos estudios de la participación de Mupp-1 en la movilidad de R2 en membrana celular *in vivo* en un sistema de sobreexpresión.

Los receptores pertenecientes a los GPCR presentan complejos de asociaciones proteicas en sus secuencias intracelulares denominados “signalosomas” (El Far et al., 2002). De acuerdo a esto hace sentido postular que las proteínas que forman estos complejos afectan los movimientos laterales de los receptores emplazado en la membrana celular. Una de las proteínas candidatas a formar parte del signalosoma del receptor GABA_B es Mupp-1 (proteína con múltiples motivos PDZ), ya que se ha reportado que interactúa con GABA_BR2 *in vitro* (Ige et al., 2001). La interacción de Mupp-1 con GABA_BR2 se realiza entre el dominio 13 PDZ de Mupp-1 y una secuencia de R2 de unión a PDZ ubicada 10 aminoácidos río abajo del dominio *coiled-coil* que interactúa con el extremo C-terminal de R1.

Mupp-1 se encuentra constitutivamente presente en células HEK293, por lo tanto se podría pensar que los resultados discutidos en la sección 4.3, representan una movilidad ya restringida por proteínas del tipo Mupp1. Sin embargo debido a la alta movilidad de R2, es factible que la sobreexpresión de esta subunidad, esté por encima de la cantidad de Mupp-1 endógeno disponible para interactuar con la totalidad del R2 expresado y por lo tanto que dicha restricción sea insignificante. Para estudiar en detalle el efecto de Mupp1 decidimos sobreexpresar en las células HEK293 una construcción de Mupp-1 cotranfectándola con R2-GFP.

La construcción de Mupp-1-HA (contiene el epítipo HA) nos fue proporcionada por Julia White (Ige et al., 2001). Para la cotransfección Mupp-1/R2-GFP se realizó una estandarización de

la relación de los pDNAs, necesaria para obtener un alto porcentaje de cotransfección, debido a que solo R2 se expresa unida a un epítipo fluorescente (tabla 2). Además la expresión de membrana de Mupp-1 fue corroborada en células COS-7, mediante inmunofluorescencia de células cotransfectadas con Mupp-1-HA y R2-GFP (Fig. 18), evidenciándose una colocalización de ambas proteínas en la membrana celular.

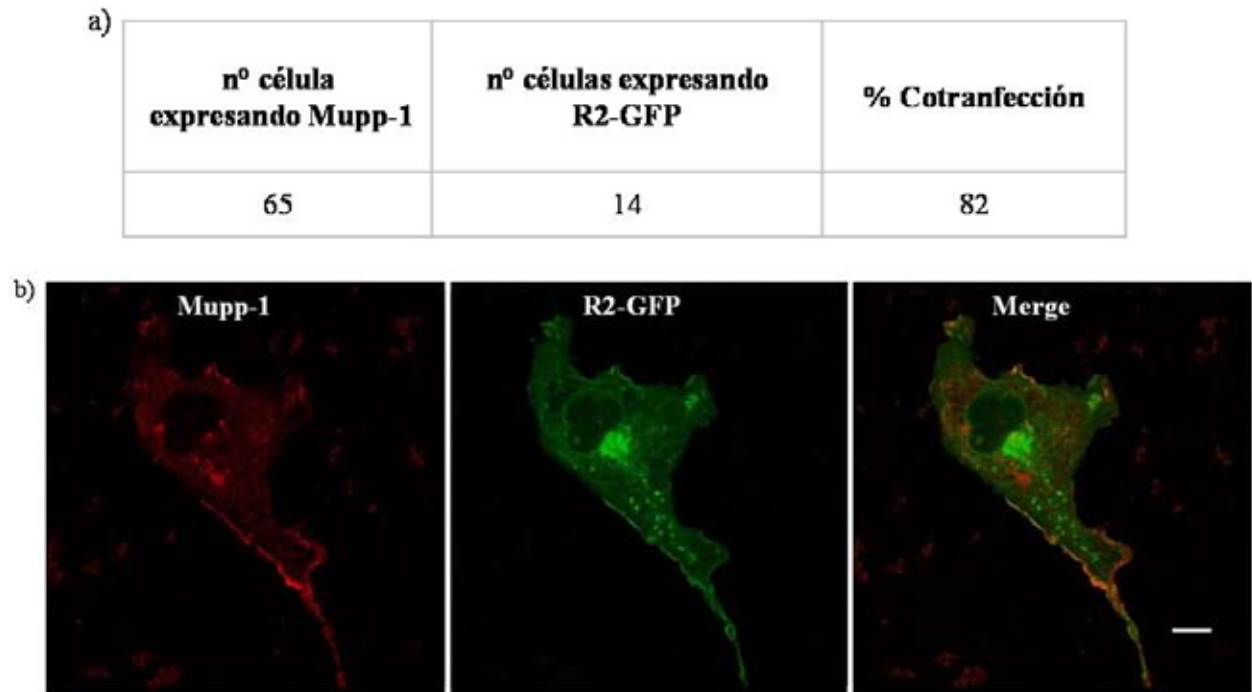


Figura 18. **Coexpresión de Mupp-1 y R2-GFP en células COS-7.** a) Estandarización de la relación de pDNA de la cotransfección Mupp-1/R2-GFP. Se cotransfectaron células COS-7 con Mupp-1/R2-GFP, utilizando una relación de pDNA de 200:1. Se realizó inmunofluorescencia de las células luego de 48 hrs postransfección, detectando Mupp-1 con anti-HA, como anticuerpo secundario se utilizó anti- mouse Texas Red. Luego se cuantificaron las células que expresaban Mupp-1 y R2-GFP mediante microscopía de fluorescencia. El porcentaje expresado corresponde a las células cotransfectadas con Mupp-1/R2-GFP. b) Inmunofluorescencia detectando Mupp-1-HA. Las células fueron cotransfectadas con Mupp-1/R2-GFP (200:1), luego de 48 postransfección se realizó la inmunodetección en células intactas de Mupp-1 con los anticuerpos anti-HA y anti-mouse Texas Red como anticuerpo secundario. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía confocal con láser a 488 y 543 nm, para detectar R2-GFP y Mupp-1 respectivamente. En el panel se muestra una célula cotransfectada con Mupp-1/R2-GFP y su correspondiente colocalización (merge). La escala de barra corresponde a 10 μ m.

Las curvas de recuperación de la fluorescencia de R2-GFP y Mupp-1/R2-GFP presentan una cinética de recuperación similar (Fig. 19b). Al analizar estadísticamente los valores FME no existe una diferencia estadísticamente significativa en el *pool* móvil de R2-GFP en presencia o ausencia de Mupp-1 (ver leyenda de fig. 19b). Lo cual nos indica que Mupp-1 no afecta la movilidad de R2 en la membrana celular de células HEK293.

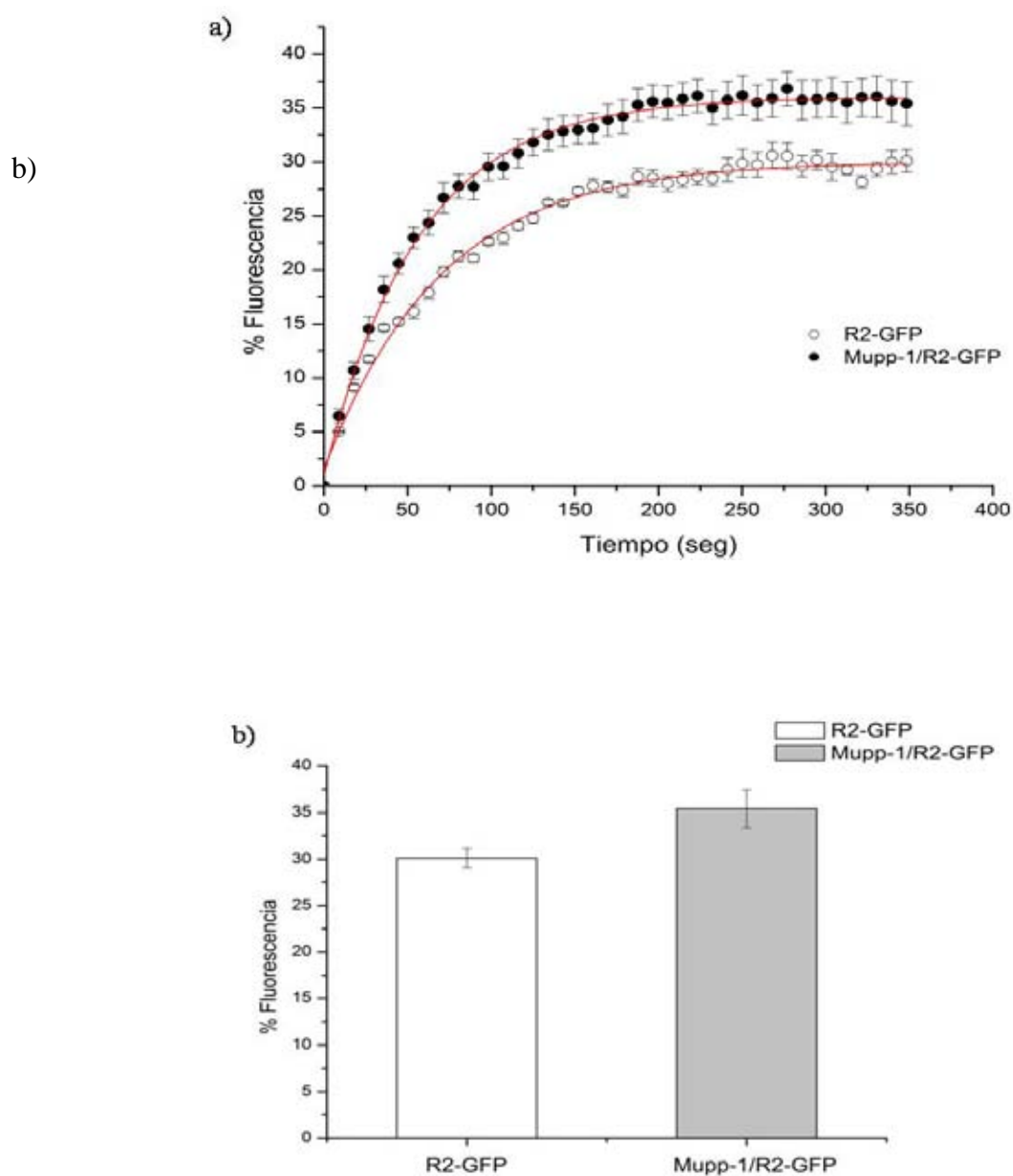


Figura 19 **FRAP de R2-GFP y Mupp-1/R2-GFP en células HEK293**. Las células fueron transfectadas con R2-GFP y Mupp-1/R2-GFP (200:1), luego de 48 hrs. postransfección se obtuvo la imagen de una célula positiva para R2-GFP a la que se realizó FRAP. a) Cuantificación de la recuperación de la fluorescencia de una región analizada utilizando el software Image J. Al valor máximo de fluorescencia de una región no fotoblanqueada, y equivalente a la fluorescencia previa al fotoblanqueamiento de la región analizada, se le asignó un valor de 100%. b)

Porcentajes de recuperación máximo empírico de la fluorescencia de R2-GFP y Mupp-1/R2 Δ C-GFP. El número de células analizadas por experimento es: R2-GFP n° = 3 y Mupp-1/R2-GFP n° = 7. Se empleó el análisis estadístico t-test: R2-GFP / Mupp-1/R2-GFP = 0,157 (P <0.05).

5. Discusión

Desde los primeros reportes que daban cuenta de la existencia del receptor GABA_B, los Neurocientíficos fueron reconociendo en este receptor características desconocidas y algunas contradictorias, que definían un receptor muy particular. Los estudios del receptor GABA_B fueron en sus inicios dirigidos a reconocer la participación de mecanismos ya descritos para otros GPCR, en especial los relacionados con los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), debido a la similitud entre ambos (Kaupmann et al., 1997). Con el tiempo esta situación se ha invertido y hoy en día se estudian particularidades del receptor GABA_B en receptores de glutamato.

Clásicamente los GPCRs evidencian una internalización desde la membrana plasmática agonista-dependiente mediada por arrestina. La internalización del receptor metabotrópico de glutamato es apreciable a los 15 min de estimulación con su agonista, mientras este fenómeno es observado para el receptor de hormonas tirotrópicas (TRHR) a los 5 min, pero frente a estos tratamientos los receptores GABA_B no sufren este fenómeno en neuronas hipocampales, corticales ni en células COS-7 (Fairfax et al., 2004). En el mismo estudio intentando desestabilizar este receptor de la membrana plasmática de neuronas se trataron crónicamente las neuronas con baclofen, evidenciándose una disminución de los receptores en la superficie neuronal de solo un 30% luego de 60 hrs. de incubación, siendo discutibles las implicancias fisiológicas de tratamientos tan prolongados con agonista.

Los resultados obtenidos en la presente tesis nos permiten decir que el *pool* de receptores nativos se mantiene constante luego de tratamiento crónico con agonista en células COS-7 (ver fig. 5b). Esta particularidad de los receptores GABA_B puede deberse a la permanencia de una

proporción de receptores en la membrana celular durante las 12 hrs de incubación con agonista y además a “nuevos” receptores que durante el período de incubación se insertaron en la membrana reemplazando a otros internalizados. Esto reproduce lo descrito en neuronas corticales detectando la subunidad R1 del receptor (Fairfax et al., 2004) y nos permite decir que nuestro sistema de expresión además de reproducir la distribución celular de R1 y R2 (Ver fig. 4), es capaz de mantener las propiedades de estabilidad en la membrana celular del receptor GABA_B.

Para saber si el *pool* de receptores estable en la superficie celular corresponde a receptores que permanecen por largos tiempos emplazados en la membrana y no es producto de un mantenimiento del equilibrio del número de estos con una dinámica de degradación-inserción, se podría realizar el mismo método de biotinylicación utilizado en esta tesis, pero modificándolo. La modificación consistiría en biotinylicar las proteínas de superficie en el momento que se inician las incubaciones con agonista, así las proteínas biotinylicadas que posiblemente sufren endocitosis y degraden resultarán en una disminución de la recuperación de estas. Lo que dará cuenta de un *pool* de receptores que presentan o no un recambio dinámico en la superficie celular. Además podría interferirse la fusión de vesículas en la membrana celular y la síntesis proteica.

La idea de que los extremos C-terminal del receptor estuvieran involucradas en el mantenimiento de un *pool* estable de este en la superficie celular, nos llevó a pensar que en nuestro sistema, la transfección de construcciones de las subunidades del receptor truncadas (R1ΔC/R2ΔC) y su posterior tratamiento crónico con baclofen (12 hrs), resultaría en una disminución del *pool* de receptores de superficie, posiblemente debido a la pérdida de interacción con otras proteínas que contribuyeran a la estabilidad del receptor. Sin embargo al deleccionar de sus extremos C-terminal al receptor GABA_B se obtuvo el mismo comportamiento frente a agonista que el receptor nativo (ver fig. 7). Por lo tanto la permanencia del *pool* de receptores

GABA_B en la superficie de células COS-7 es agonista-independiente a las 12 hrs. de tratamiento con baclofen y los extremos C-terminal del receptor no afectan este comportamiento.

Es posible que las secuencias críticas para la desestabilización de los receptores GABA_B desde la membrana celular se encuentren en otros dominios proteicos como extremos amino terminales o dominios transmembrana. Lo que se podría establecer estudiando construcciones truncadas o con mutaciones puntuales de estos dominios.

El *pool* de receptores GABA_B en la superficie neuronal se mantiene constante al inhibir la maquinaria degradativa del lisosoma (Fairfax et al., 2004). Esto indica que el receptor no sufre endocitosis seguida de tráfico hacia este organelo. Es probable que los receptores se destinen en baja proporción desde la superficie celular directamente al proteosoma, lo que evitaría la acumulación de un *pool* de receptores internalizados.

Dado que el receptor se encuentra endógenamente en regiones sinápticas, no podemos descartar la participación del extremo C-terminal de éste en la permanencia en la superficie celular neuronal, ya que es posible que la conformación proteica de nuestro sistema de sobreexpresión carezca de algún componente implicado en la desestabilización del receptor desde la superficie neuronal.

Los ensayos de aumento de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 demostraron que la activación del receptor por baclofen aumenta los niveles de fosfo-ERK1/2 intracelulares y que esta fosforilación llega a un máximo luego de 5 min de incubación con baclofen en células HEK293 que expresan el receptor GABA_B (Ver fig. 8). Además el aumento de la fosforilación de ERK1/2 con doble pulso de agonista (Ver fig. 9), da cuenta de una pérdida de actividad de los receptores luego de una incubación crónica con baclofen. Por lo tanto, los resultados sugieren la

existencia de un proceso de desensibilización agonista-dependiente de los receptores GABA_B en la superficie celular de células HEK293.

La desensibilización del receptor GABA_B ha sido recientemente publicada, demostrándose que NSF participaría en ésta vía PKC dependiente, tanto en líneas celulares como en neuronas hipocámpales. La proteína NSF habitualmente participa en la regulación de complejos que actúan en la fusión de membranas y tráfico de receptores, pero su interacción con el receptor GABA_B solo estaría favoreciendo la desensibilización sin afectar su estabilidad en la membrana celular (Pontier et al., 2006).

La respuesta a baclofen disminuida de los receptores GABA_B, luego del tratamiento crónico puede atribuirse a la activación de unos pocos receptores que previamente no estuvieron en contacto con agonista y se insertaron en la membrana celular en tiempos cercanos al segundo pulso corto de baclofen (5 min), o bien a la activación de unos pocos receptores que permanecieron en la membrana y se encontraban en vía de degradación lenta.

La metodología utilizada para los experimentos de desensibilización contempla un lavado para eliminar el baclofen del primer pulso (o/n) y luego de este se aplica el segundo pulso corto (5 min) de agonista. Por esto es importante contemplar la posibilidad que el tiempo transcurrido entre los dos pulsos de agonista pudo favorecer la resensibilización de algunos receptores, evidenciada por un aumento de la fosforilación de las proteínas ERK1/2.

Los resultados discutidos atribuyen características al receptor GABA_B que llevan a pensar que el *pool* de receptores que permanece en la membrana celular y es susceptible a desensibilización, puede presentar movimientos dinámicos en membrana celular.

De acuerdo a nuestros resultados el receptor GABA_B es móvil en la membrana celular de células HEK293 presentando un porcentaje de recuperación de 20%. De acuerdo a datos

publicados de otros receptores como el receptor de glutamato NR1 (NMDA) por ejemplo, que presenta una recuperación máxima del 30% de la fluorescencia en espinas dendríticas (Sharma et al., 2006), el receptor GABA_B se encontraría restringido en sus movimientos en la membrana celular, presentando un bajo *pool* de proteínas móviles.

La subunidad R2 presenta un extremo C-terminal con mayor número de residuos aminoacídicos que R1 (Jones et al., 1998), por lo cual este dominio puede tener un rol importante en los movimientos del receptor en la membrana celular, ya que posiblemente interaccionaría con proteínas de “anclaje”. Los resultados obtenidos sugieren una participación del dominio C-terminal de R2 en la movilidad de la subunidad en membrana celular.

Si bien los ensayos realizados delecionando de su extremo C-terminal a la subunidad R2, aumentan la cantidad de la fracción móvil (FME 45%) de esta proteína en la membrana celular, es importante hacer notar que la subunidad nativa es en si una proteína con una alta movilidad en membrana celular teniendo una recuperación máxima del 30% de la fluorescencia (ver figura 16b), la que disminuye en presencia de R1 a un 20%.

Por tanto podemos decir que en la restricción de los movimientos del receptor GABA_B en la membrana celular de células HEK293 participa la subunidad R1 y el extremo carboxilo terminal de R2. Esto indica que el receptor puede ser suficientemente móvil como para presentar una dinámica de movimientos que les permitan integrarse, insertarse o removerse de dominios de membrana con cierta facilidad.

Es sabido que receptores como mGluRs presentan una dinámica de movimientos laterales en las superficies neuronales, los que les permiten moverse dentro y fuera de las densidades sinápticas (Triller et al., 2005). Esta característica permite a la célula redistribuir los receptores

según sea necesario por los distintos dominios de la superficie celular sin necesidad de sintetizar nuevas proteínas.

Los receptores GABA_B se sitúan en regiones periféricas a la densidad sináptica y la posible movilidad de estos en células neuronales podría deberse a fenómenos de plasticidad sináptica.

Como ya hemos revisado en esta tesis (ver introducción) existen proteínas que se han encontrado interactuando con el receptor GABA_B *in vitro*, varias de ellas específicamente con el extremo C-terminal de R2. Una de estas proteínas es Mupp-1 que presenta múltiples dominios PDZ y que interactúa con proteínas de citoesqueleto (Calver et al., 2002). El comportamiento de R2-GFP en presencia de Mupp-1 recombinante no difiere significativamente al que experimenta la subunidad en ausencia de Mupp-1 (Ver fig. 19). Por tanto descartamos la participación de Mupp-1 en los movimientos que experimenta la subunidad R2 en nuestro sistema de sobreexpresión.

En base a los resultados expuestos es posible formular la siguiente conclusión:

El receptor GABA_B es muy estable en la membrana celular, característica en la cual los extremos carboxilo terminal del receptor no están involucrados. Sin embargo el receptor sería susceptible a desensibilizarse luego de tratamientos crónicos. Además el receptor experimenta una dinámica de movimientos en la membrana celular, la que es restringida por la subunidad R1 y el extremo carboxilo terminal de la subunidad R2 en células HEK293”.

6. Bibliografía

Ango F, Robbe D, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Pin JP, Bockaert J, Fagni L (2002). Homer-dependent cell surface expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in neurons. *Mol Cell Neurosci* 20, 323–329.

Becher A, White JH, McIlhinney RA (2001). The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J Neurochem* 79, 787–795.

Benzing T, Yaffe MB, Arnould T, Sellin L, Schermer B, Schilling B, Schreiber R, Kunzelmann K, Leparac GG, Kim E, Walz G (2000). 14-3-3 interacts with regulator of G protein signaling proteins and modulates their activity. *J Biol Chem* 275, 28167–28172.

Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J, Turnbull M (1980). (–)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* 283, 92–94.

Brock C., Boudier L., Maurel D., Blahos J. and Pin JP. (2005). Assembly-dependent Surface Targeting of the Heterodimeric GABAB Receptor Is Controlled by COPI but Not 14-3-3. *Molecular Biology of the Cell* 16, 5572–5578.

Cain CR. and Simmonds MA. (1982). Effects of baclofen on the olfactory cortex slice preparation. *Neuropharmacology* 21, 371-373.

Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, Boyfield I, Wood MD, Russell RB, Price GW, Couve A, Moss SJ, Pangalos MN (2001). The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci* 21, 1203–1210.

Chuang T., Iacovelli L., Sallese M. and De Blasi A. (1996). G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *TiPS* 17, 416-421.

Couve A, Filippov AK, Connolly CN, Bettler B, Brown DA, Moss SJ (1998). Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem* 273, 26361–26367.

Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. (2000). GABAB receptors: A new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci* 16, 296–312.

Couve A, Kittler JT, Uren JM, Calver AR, Pangalos MN, Walsh FS, Moss SJ (2001). Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci* 17, 317–328.

Couve A, Thomas P, Calver AR, Hirst WD, Pangalos MN, Walsh FS, Smart TG, Moss SJ (2002). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABAB receptor-effector coupling. *Nat Neurosci* 5, 415–424.

Couve A., Calver A., Fairfax B., Moss S. And Pangalos M. (2004). Unravelling the unusual signalling properties of the GABAB receptor. *Biochem Pharmacol.* 68(8), 1527-36 Review.

Couve A., Restituto S., Brandon JM., Charles KJ., Bawagan H., Freeman KB. (2004). Marlin-1 a novel RNA binding protein associates with GABA(subB) receptors. *J Biol Chem* 279, 13934–43.

Dolphin AC, Huston E, Scott RH (1990). Direct and indirect modulation of neuronal calcium currents by G-protein activation. *Biochem Soc Symp* 56, 45–60.

Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin JP, Prezeau L (2001). A single subunit (GB2) is required for G protein activation by the heterodimeric GABAB receptor. *J Biol Chem* 277, 3236–3241.

El Far O, Betz H (2002). G-protein coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *Biochem J* 365, 329–36.

Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H (1999). GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: Developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci* 11, 761–768.

Gahwiler BH, Brown DA (1985). GABAB-receptor-activated K⁺ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1558–1562.

Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L, Pin JP (2001). Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function. *EMBO J* 20, 2152–2159.

Gassmann M., Shaban H., Vigot R., Sansig G, Haller C., Barbieri S, Humeau Y., Schuler V., Müller M., Kinzel B., Klebs K., Schmutz M., Froestl W., Heid J., Kelly P., Gentry C., Jatón A., Van der Putten H., Mombereau C., Lecourtier L., Mosbacher J., Cryan J., Fritschy J., Lüthi A., Kaupmann K. and Bettler B. (2004). Redistribution of GABAB(1) Protein and Atypical GABAB Responses in GABAB(2)-Deficient Mice. *The Journal of Neuroscience* 24, 6086–6097.

Gonzalez-Maeso J, Wise A, Green A, Koenig JA (2003). Agonist-induced desensitization and endocytosis of heterodimeric GABAB receptors in CHO-K1 cells. *Eur J Pharmacol* 481, 15–23.

Grünewald S, Schupp BJ, Ikeda SR, Kuner R, Steigerwald F, Kornau HC, Kohr G(2002). Importance of the gamma-aminobutyric acid(B) receptor C-termini for G-protein coupling. *Mol Pharmacol* 61, 1070–1080.

Harata N., Ryan T., Smith S., Buchanan J. and Tsien R. (2001). Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion. *PNAS* 98, 12748–12753.

Hill DR, Bowery NG (1981). 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290,149–152.

Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396, 674–679.

Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 239–246.

Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683–687.

Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683–687.

Kniazeff J, Galvez T, Labesse G, Pin JP (2002). No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J Neurosci* 22, 7352–7361.

Kulik A., Vida I., Luján R., Haas C., López-Bendito G., Shigemoto R., and Frotscher M. (2003). Subcellular Localization of Metabotropic GABAB Receptor Subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 23 , 11026–11035.

Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC (1999). Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283, 74–77.

Lujan R, Shigemoto R, Kulik A, Juiz JM. (2004). Localization of the GABAB receptor 1a/b subunit relative to glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *J Comp Neurol.* 475, 36-46.

Lujan R, Shigemoto R. (2006). Localization of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. *Eur J Neurosci.* 2006 23, 1479-1490.

Malitschek B, Schweizer C, Keir M, Heid J, Froestl W, Mosbacher J, Kuhn R, Henley J, Joly C, Pin JP, Kaupmann K, Bettler B (1999). The N-terminal domain of gamma-aminobutyric acid(B) receptors is sufficient to specify agonist and antagonist binding. *Mol Pharmacol* 56 , 448–454.

Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97–106.

Martin SC, Russek SJ, Farb DH (2001). Human GABA(B)R genomic structure: Evidence for splice variants in GABA(B)R1 but not GABA(B)R2. *Gene* 278, 63–79.

Mintz IM, Bean BP(1993). GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 10, 889–898.

Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889–897.

Nehring RB, Horikawa HP, El Far O, Kneussel M, Brandstatter JH, Stamm S, Wischmeyer E, Betz H, Karschin A (2000). The metabotropic GABAB receptor directly interacts with the activating transcription factor 4. *J Biol Chem* 275, 35185–35191.

Pérez-Garci E., Gassmann M., Bettler B. and Larkum M (2006). The GABAB1b Isoform Mediates Long-Lasting Inhibition of Dendritic Ca²⁺ Spikes in Layer 5 Somatosensory Pyramidal Neurons. *Neuron* 50, 603–616.

Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S, Bouvier M (2003). Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* 22, 3816–3824.

Pontier S., Lahaie N., Ginham R., St-Gelais F., Bonin H., Bell DJ., Flynn H., Trunseau L., McIlhinney J., White J. And Bouvier M. (2006). Coordinated action of NSF and PKC regulates GABA_B receptor signaling efficacy. *Embo J.* 25 Mayo.

Potashner SJ (1978). Baclofen: Effects on amino acid release. *Can J Physiol Pharmacol* 56, 150–154.

Prosser HM, Gill CH, Hirst WD, Grau E, Robbins M, Calver A, Soffin EM, Farmer CE, Lanneau C, Gray J, Schenck E, Warmerdam BS, Clapham C, Reavill C, Rogers DC, Stean T, Upton N, Humphreys K, Randall A, Geppert M, Davies CH, Pangalos MN (2001). Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in gaba(b1)-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17, 1059–1070.

Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, Hirst WD, Russell RB, Wood MD, Nasir S, Couve A, Brown DA, Moss SJ, Pangalos MN (2001). GABAB2 is essential for G-protein coupling of the GABAB receptor heterodimer. *J Neurosci* 21, 8043–8052.

Sallese M., Salvatore L., D'Urbano E., Sala G., Storto M., Launey T., Nicoletti F., Knopfel T., and De Blasi A. (2000). The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J.* 14, 2569–2580.

Sauter K, Kaupmann K, Bettler B, Mohler H, Benke D (2001). Direct interaction of GABA(B) receptors with the transcription factor CHOP. *FENS Abstr* 1, 144.12.

Scholz KP, Miller RJ(1991). GABAB receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 444, 669–686.

Sharma K., Fong D., and Craiga A. (2006). Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: Long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Mol Cell Neuroc.* 31, 702–712.

Triller A. and Choquet D. (2005). Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move!. *TRENDS in Neurosciences* 28, 133-139.

Tsao P, von Zastrow M (2000). Downregulation of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10, 365–369.

Vigot R., Barbieri S., Braüner-Osborne H., Turecek R., Shigemoto R., Zhang Y., Luján R., Jacobson L., Biermann B., Fritschy J., Vacher C., Müller M., Sansig G., Guetg N., Cryan J., Kaupmann K., Gassmann M., Oertner T. and Bettler B. (2006). Differential Compartmentalization and Distinct Functions of GABAB Receptor Variants. *Neuron* 50, 589–601.

Villemure J, Adam L, Nicola J. Bevan N, Gearing K, Chénier S and Bouvier M (2005). Subcellular distribution of GABAB receptor homo- and hetero-dimers *Biochem. J* 388, 47–55.

Waldmeier PC, Wicki P, Feldtrauer JJ, Baumann PA (1988). Potential involvement of a baclofensensitive autoreceptor in the modulation of the release of endogenous GABA from rat brain slices in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337, 289–295.

White JH, Ginham RL, Pontier S, Wise A, Blein S, Barlow P, Bouvier M, McIlhinney RAJ (2002). The heterodimeric GABA-B receptor and associated proteins. *FENS Abstr* 1, 062.1.

White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396, 679–682.

Yuan H., Michelsen K. and Schwappach B. (2003). 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr. Biol.* 13, 638–646.

Zhou Y, Schopperle WM, Murrey H, Jaramillo A, Dagan D, Griffith LC, Levitan IB (1999). A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron* 22, 809–818.