



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Clonación molecular, expresión y análisis electrofisiológico de una
subunidad de un receptor homomérico al GABA del acocil *Procambarus
clarkii***

T E S I S

Que presenta

M. en C. Eric Nahum Jiménez Vázquez

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dr. Ubaldo García Hernández

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

México, D.F.

Noviembre, 2015

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	ii
Resumen	iii
Resumen gráfico	v
Introducción	1
Antecedentes generales y específicos	5
1. Canales iónicos activados por ligando	5
<i>Estructura</i>	6
<i>Clasificación</i>	8
2. Canales iónicos activados por el GABA.....	13
<i>Receptores ionotrópicos</i>	13
<i>Receptores metabotrópicos</i>	20
3. El GABA como neurotransmisor excitador.....	23
<i>Actividad excitadora en vertebrados</i>	23
<i>Actividad excitadora en invertebrados</i>	27
4. Receptores homoméricos activados por el GABA.....	32
5. <i>Procambarus clarkii</i>	38
Justificación	42
Hipótesis	45
Objetivos	45
General	45
Específicos	45
Métodos	46
Resultados y conclusiones	56
Discusión	85
Referencias	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AChRs	Receptores a la acetilcolina
Asa- <i>cis</i>	Asa de dicisteínas
<i>c</i> -ACA	Ácido <i>cis</i> -4-aminocrotónico
E_{Cl^-}	Potencial de equilibrio del cloruro
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A RS	Receptores ionotrópicos al GABA
GlyRs	Receptores a la glicina
GRD	Receptor tipo-GABA/glicina
HEK	Células Embrionarias de Riñón Humano
iGluRs	Receptores ionotrópicos para glutamato
KCC2	Transportador de iones Potasio-Cloruro
LCCH3	Canal homólogo 3 de los canales selectivos a cloruro activados por ligando
LGICs	Canales iónicos activados por ligando
NKCC1	Transportador de iones Sodio-Potasio-Cloruro
NMDG	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -glucamina
PEI	Polietilenimina
PTX	Picrotoxina
RACE	Amplificación Rápida de Extremos de ADNc
RDL	Canal resistente a dieldrina
SSC	Solución salina de citrato
<i>t</i> -ACA	Ácido <i>trans</i> -4-aminocrotónico
TMs	Dominios transmembranales
TPMPA	Ácido metilfosfínico

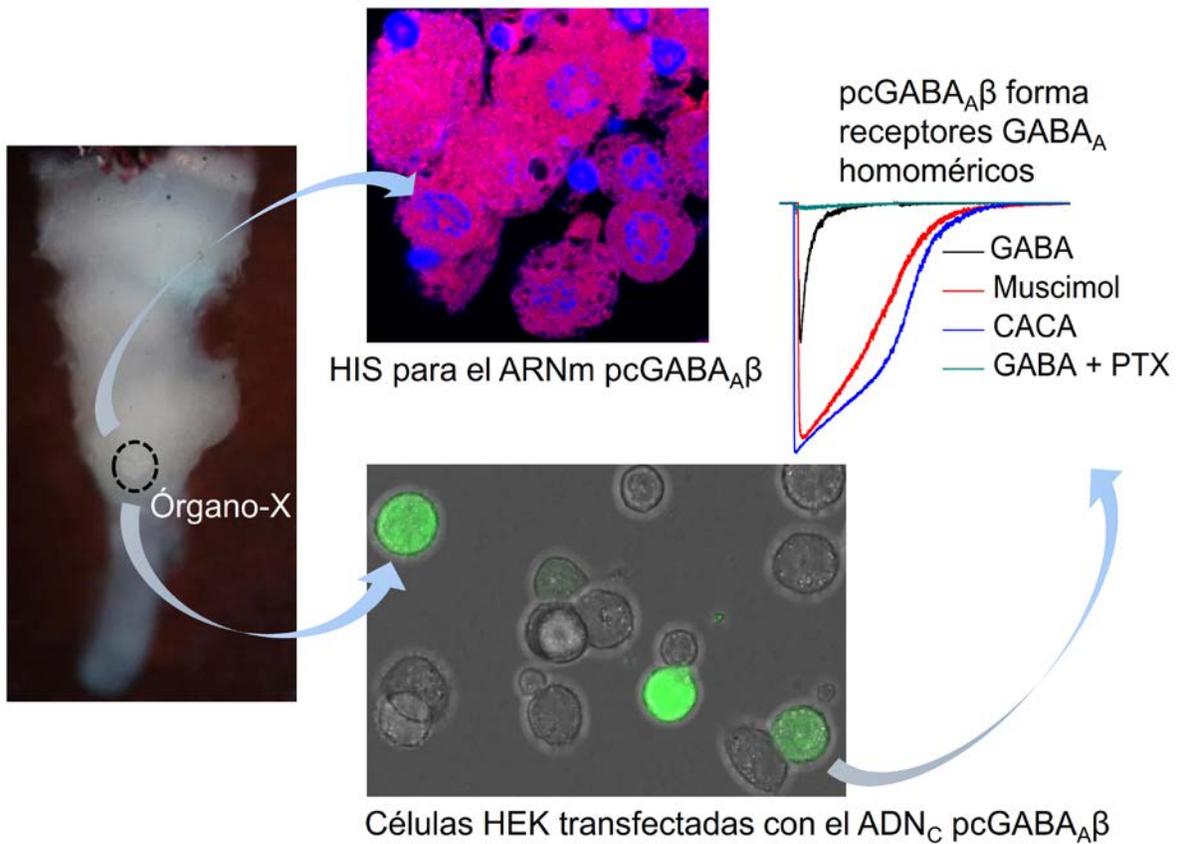
RESUMEN

Las herramientas moleculares han permitido clonar una amplia diversidad de receptores hetero-oligoméricos activados por ligando. Asimismo, la investigación tan amplia de la estructura molecular del receptor al ácido γ -aminobutírico (GABA) ha sido de gran importancia para entender la función del sistema nervioso tanto en vertebrados como en invertebrados. Sin embargo, únicamente dos tipos de canales homoméricos selectivos a Cl^- activados por el GABA se han descrito ampliamente. Primero, en la retina de vertebrados se identificó que la subunidad $\text{GABA}_{\rho 1}$ forma receptores homo-oligoméricos; por otro lado, en invertebrados se aisló un ADNc que codifica para un canal de cloruro activado por el GABA a partir de una biblioteca de ADNc de *Drosophila melanogaster*. Cuando se expresaron en sistemas de expresión heterólogos, esas subunidades fueron capaces de funcionar como un complejo homo-oligomérico. Con el fin de investigar la estructura y función de los canales que responden al GABA en el acocil *Procambarus clarkii*, clonamos una subunidad y la expresamos en células HEK. Los registros electrofisiológicos mostraron que esta subunidad es capaz de formar un receptor ionotrópico homomérico al GABA y que genera una corriente de Cl^- insensible a bicuculina. El análisis farmacológico determinó que el orden de potencia de los agonistas probados fue: GABA > ácido *trans*-4-aminocrotónico (*t*-ACA) = ácido *cis*-4-aminocrotónico (*c*-ACA) > muscimol. Adicionalmente, los datos electrofisiológicos apoyan la noción de que las células neurosecretoras del órgano-X expresan al menos dos subunidades que son responsables de la formación de receptores homo- y heteroméricos. Con experimentos de hibridación *in situ* demostramos que la gran mayoría de las neuronas del órgano-X del tallo ocular del acocil expresan la subunidad aislada pcGABA β . Este estudio ayudará a incrementar el conocimiento de la genética del acocil, además del entendimiento de esta importante familia de receptores, y proveerá una idea sobre cómo han evolucionado esos genes entre vertebrados e invertebrados. También, dado que el acocil se considera como una especie indeseable, la subunidad aislada podría representar un blanco importante para descubrir nuevos fármacos que inhiban su migración.

ABSTRACT

Molecular cloning has introduced an unexpected large diversity of neurotransmitter hetero-oligomeric receptors. Extensive research on the molecular structure of the γ -aminobutyric acid (GABA) receptor has been of great significance for understanding how the nervous system works in both vertebrates and invertebrates. However, only two examples of functional homo-oligomeric GABA-activated Cl^- channels have been reported. In the vertebrate retina, the GABA ρ 1 subunit of various species forms homo-oligomeric receptors; in invertebrates, a cDNA encoding a functional GABA-activated Cl^- channel has been isolated from a *Drosophila melanogaster* head cDNA library. When expressed in *Xenopus laevis* oocytes, these subunits function efficiently as a homo-oligomeric complex. To investigate the structure-function of GABA channels from the crayfish *Procambarus clarkii*, we cloned a subunit and expressed it in HEK cells. Electrophysiological recordings show this subunit forms a homo-oligomeric ionotropic GABA receptor that gates a bicuculline-insensitive Cl^- current. The order of potency of the agonists was GABA > *trans*-4-amino-crotonic acid (*t*-ACA) = *cis*-4-aminocrotonic acid (*c*-ACA) > muscimol. These data support the notion that X-organ sinus gland neurons express at least two GABA subunits responsible for the formation of hetero-oligomeric and homo-oligomeric receptors. In addition, by *in situ* hybridization studies we demonstrated that a majority of X-organ neurons from crayfish eyestalk express the isolated pcGABA $\alpha\beta$ subunit. This study increases knowledge of the genetics of the crayfish, furthers the understanding of this important neurotransmitter receptor family, and provides insight into the evolution of these genes among vertebrates and invertebrates. Also, since the crayfish has been considered an undesirable species, the isolated subunit might represent an important target to discover new molecules that inhibit crayfish migration.

RESUMEN GRAFICO



Este estudio describe una subunidad de un receptor al GABA aislada de neuronas del órgano-X que forma canales iónicos activados por ligando. Cuando se expresó en células HEK 293T, fue capaz de formar receptores al GABA cuyo arreglo estequiométrico es de tipo homo-oligomérico con un poro de selectividad a cloruro. Sorpresivamente, esos GABARs mostraron una farmacología diferencial con respecto a los receptores homoméricos GABA_ρ descritos en vertebrados, así como también con los receptores “tipo-RDL” hallados en invertebrados.

INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGICs, por sus siglas en inglés) juegan un papel importante en la comunicación intercelular cerebral, convirtiendo una señal química (típicamente un incremento local en la concentración extracelular del neurotransmisor) en una señal eléctrica, la cual se genera debido al flujo iónico a través de la membrana postsináptica (Katz, 1966; Calimet et al., 2013). Estos receptores han sido involucrados en diversos procesos que son fundamentales, como la atención, el aprendizaje y la memoria. El lograr entender su función al nivel molecular ha resultado útil para el desarrollo de fármacos que permiten tratar una amplia gama de desórdenes como la adicción a la nicotina, la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y la depresión (Changeux and Edelstein, 2005).

Dentro de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando se encuentran los receptores del asa-*cis*. Esta subfamilia incluye canales activados por diversos neurotransmisores, tales como la acetilcolina, la serotonina, la glicina y el ácido γ -aminobutírico (GABA). Los receptores del asa-*cis* median la neurotransmisión ionotrópica rápida, y están formados por la oligomerización de 5 subunidades arregladas simétricamente alrededor de un poro iónico central. La unión del GABA a sus receptores ionotrópicos (GABA_ARs) provoca un cambio conformacional que culmina con la apertura del poro central permitiendo que los iones cloruro fluyan a través del canal a favor de su gradiente electroquímico. En vertebrados se han descrito dos clases de GABA_ARs: los receptores GABA_A que son antagonizados por la bicuculina; y una subclase de receptores GABA_A (GABA _{ρ}) que son insensibles a este antagonista. Los receptores GABA_A son regulados por moduladores alostéricos como barbitúricos y benzodiazepinas (Sieghart, 1995; Mohler et al., 2002). Los receptores GABA_A además muestran una menor sensibilidad al agonista principal y una cinética más rápida en comparación con los receptores GABA _{ρ} , los cuales son insensibles a la mayoría de esos moduladores. Sin embargo, ambas clases de receptores son antagonizadas por un bloqueador de poro, la picrotoxina (PTX). De

manera interesante, los GABA_ARs de invertebrados que han sido usados como blancos para insecticidas, pesticidas y antiparasitarios, también son antagonizados por PTX, y muchos de ellos son insensibles a bicuculina, difiriendo de los receptores GABA_A y GABA_ρ en su respuesta a análogos del GABA y a moduladores alostéricos (Ffrench-Constant et al., 1993; Martin, 1993; Buckingham and Sattelle, 2004; Ishaaya and Horowitz, 2009).

En vertebrados existen múltiples genes que codifican para las subunidades de los GABA_ARs, las cuales se clasifican en: α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ϵ , θ , π y ρ 1–3. Esas subunidades se co-ensamblan en diferentes combinaciones durante el desarrollo neuronal para formar receptores funcionales. Aunque algunos subtipos son homopentámeros, la mayoría de los GABA_ARs nativos son heterómeros (Olsen and Sieghart, 2008). En insectos y crustáceos, los canales de cloruro activados por el GABA están altamente expresados en nervios y células musculares. Estos GABA_ARs se asemejan en gran parte a aquellos encontrados en vertebrados debido a su sensibilidad a la PTX, pero con la discrepancia de que no se clasifican directamente en las categorías de los receptores GABA_A/GABA_ρ de vertebrados, sino como receptores “tipo- α , β , etc.” (Sattelle et al., 2000; Buckingham et al., 2005; Narusuye et al., 2007). La clonación de subunidades putativas de los GABA_ARs en *Drosophila melanogaster* condujo a la identificación del gen para resistencia a dieldrina (*rdl*), un blanco importante para insecticidas (Ffrench-Constant, 1993). Subsecuentemente, la inyección del ARNm (de la subunidad aislada) en ovocitos de *Xenopus laevis* resultó en el ensamble de canales de cloruro homoméricos activados por el GABA que podían ser bloqueados por la PTX, insensibles a bicuculina (Hosie et al., 1997) y activados por los agonistas de los receptores GABA_ρ: el ácido *trans*-aminocrotónico (*t*-ACA) y el ácido *cis*-aminocrotónico (*c*-ACA) (Buckingham et al., 1994). De manera interesante, otras subunidades (del receptor tipo-GABA/glicina, GRD y el homólogo 3 de un canal de cloruro activado por ligando, LCCH3), que fueron aisladas de *Drosophila* mostraron la propiedad particular de formar canales catiónicos heteroméricos activados por el GABA (Zhang et al., 1995; Gisselmann et al., 2004; Buckingham et al., 2005). Lo que resulta

notable es que la subunidad RDL es la única conocida capaz de formar canales aniónicos homoméricos funcionales de manera nativa en invertebrados, los cuales mimetizan la farmacología de los canales iónicos neuronales activados por el GABA en insectos (Buckingham et al., 2005; Narusuye et al., 2007).

En invertebrados, el GABA actúa de la misma manera que lo hace en vertebrados, es decir, generando hiperpolarización de la membrana plasmática. Por ejemplo, en el lóbulo olfatorio del ganglio cerebroide, así como en neuronas de proyección del deutocerebro olfatorio de langosta, se describió que los receptores al GABA ionotrópicos están altamente expresados (Zhainazarov et al., 1997; Zhainazarov et al., 1999; Hollins and McClintock, 2000). Del mismo modo, en el acocil se han llevado a cabo experimentos donde se identificó que el GABA funciona como un neurotransmisor inhibitorio en las sinapsis periféricas y centrales (García et al., 1994), pero ninguna subunidad se ha aislado molecularmente. También, en neuronas del ganglio estomatogástrico de cangrejo, se encontró que el GABA puede evocar respuestas inhibitorias con componentes que son dependientes de Cl^- y de K^+ (Swensen et al., 2000). Por otro lado, únicamente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y en la mosca de la fruta *D. melanogaster*, se ha demostrado que el GABA puede funcionar como neurotransmisor excitador, generando despolarización a través de receptores homo- y heteroméricos con la capacidad de permear cationes (Beg and Jorgensen, 2003; Gisselmann et al., 2004), que no tiene relación con los cambios en la homeostasis del cloruro. Aunque las corrientes evocadas por el GABA se han descrito en crustáceos, sólo en la langosta *Homarus americanus* se ha aislado una subunidad del órgano olfatorio y del ganglio cerebroide que es capaz de formar un receptor homomérico funcional activado por el GABA, la cual se definió como una subunidad β (Hollins and McClintock, 2000). Las corrientes catiónicas activadas por este neurotransmisor se han identificado en otros organismos como los mencionados previamente, pero sigue sin haber evidencia de tales acciones en crustáceos. En este trabajo reportamos que el GABA puede mediar excitabilidad en las neuronas del órgano-X del acocil *P. clarkii*. Los estudios de sustitución iónica demostraron que el GABA puede activar corrientes que son dependientes tanto de

Cl⁻ como de Na⁺; estas últimas podrían ser debido a receptores con un filtro de selectividad de naturaleza catiónica.

En este estudio también describimos una subunidad de un GABA_AR neuronal que forma canales de cloruro homoméricos activados por ligando. Una clona completa de ADNc que codifica para una subunidad β putativa de un GABA_AR se aisló a partir de las neuronas del órgano-X del acocil *P. clarkii* mediante la técnica de RACE (Amplificación Rápida de los Extremos de ADNc), basada en una región conservada (dominio transmembranal 2, TM2) de subunidades de GABA_ARs de invertebrados. Cuando esta subunidad se expresó en células embrionarias de riñón humano (HEK) 293T, fue capaz de formar canales de cloruro homoméricos activados por el GABA. La comparación de la secuencia de amino ácidos con la única secuencia reportada de una subunidad para GABA_ARs en los crustáceos mostró una identidad del 97% pero, de manera inesperada, la expresión funcional de los GABA_ARs formados por la subunidad de *P. clarkii* mostró que los canales tienen una alta sensibilidad al c-ACA, mientras que la reportada para *H. americanus* no es sensible a este agonista. Además, los GABA_ARs formados por la subunidad aislada del acocil resultaron ser sensibles a la PTX, pero insensibles a bicuculina, tal como se mostró previamente en neuronas del órgano-X. Asimismo, los resultados que presentamos en este trabajo mediante el análisis de la distribución del ARNm pcGABA_Aβ por hibridación *in situ* incrementan la evidencia de que la subunidad del receptor para el GABA aislada ejerce una función particular en las células neuroexcretoras del órgano-X. El análisis de la estructura genética de la subunidad aislada formadora de receptores homoméricos activados por el GABA amplía el panorama referente a la superfamilia de LGICs, especialmente aquellos incluidos en la familia del asa-cis, y proporciona una nueva estrategia para el desarrollo de pesticidas específicos enfocados en el control del acocil que ha sido considerado como plaga (Ficetola, 2011).

ANTECEDENTES GENERALES Y ESPECÍFICOS

1. Canales iónicos activados por ligando

El cerebro funciona a través de una red de neuronas que se comunican rápidamente unas con otras mediante millones de sinapsis. Los LGICs median la comunicación intercelular convirtiendo la unión de un neurotransmisor –que es liberado de la terminal presináptica– en un flujo iónico a través de la membrana postsináptica (Keramidas et al., 2004). Estos receptores son proteínas integrales de membrana oligoméricas que contienen un sitio ortoestérico de unión al neurotransmisor (ligando). Cuando no hay interacción con el ligando, el canal se mantiene cerrado, y tras la unión del agonista se desencadena una serie de cambios conformacionales que terminan en la apertura del poro del receptor, proceso llamado “*gating*”. Este fenómeno, que ocurre en una escala de 10 a 100 nanosegundos, representa uno de los cambios conformacionales más rápidos en las proteínas oligoméricas (Purohit et al., 2007). Una vez que el canal se abre, el flujo de cationes o aniones a través del poro se magnifica a tal grado que millones de iones fluyen cada segundo. Por otra parte, la modulación del *gating* puede ocurrir también por la unión de moduladores endógenos o exógenos en sitios alostéricos que son topológicamente distintos a los sitios de unión ortoestéricos. Esos moduladores eventualmente tienden a modificar el balance inhibitor/excitador en el SNC. Asimismo, debido a que neurotransmisores importantes ejercen su acción a este nivel, los LGICs se han convertido en un blanco importante para nuevos agentes terapéuticos (Hogg et al., 2005).

Adicionalmente, aunada a su función bien establecida en la neurotransmisión, algunos LGICs también son importantes en células que no son excitables, como las endoteliales, lo cual sugiere que estas proteínas realizan funciones que van más allá del SNC o periférico (Lemoine et al., 2012).

Estructura

Los LGICs son proteínas cuya conformación estructural puede ser heteromérica (con diferentes tipos de subunidades) u homomérica (que incluye un sólo tipo de subunidades) en función de la asociación de las subunidades (Figura 1), y se han identificado tanto en vertebrados como en invertebrados. El alto grado de similitud estructural entre estos receptores es la base para asignarlos a una superfamilia distinta. Esta semejanza se extiende desde la secuencia primaria de aminoácidos a la estructura secundaria y terciaria de las subunidades individuales (Le Novère and Changeux, 1995; Ortells and Lunt, 1995; Vassilatis et al., 1997). Todos los LGICs son muy parecidos en longitud y las similitudes al nivel de la secuencia de aminoácidos sugieren que estas subunidades comparten la misma topología de membrana. Cada subunidad contiene un extremo amino predominantemente hidrofílico que se encuentra situado en el lado extracelular, que a su vez posee un gran número de sitios de *N*-glicosilación y que ha sido identificado como la región donde se aloja el sitio de unión al ligando (Karlin and Akabas, 1995). Las subunidades individuales de los LGICs están formadas por cuatro dominios transmembranales (TMs: M1–M4), donde el dominio TM2 constituye las paredes del canal iónico, como se ilustra en la Figura 1 (Karlin and Akabas, 1995; Unwin, 2000). Uno a uno, los dominios TMs se conectan por asas intra y extracelulares; mientras que los dominios TM1–TM2 y TM2–TM3 se encuentran unidos por asas que contienen segmentos de péptidos cortos (sólo 4 o 5 aminoácidos de longitud con respecto a la estructura del canal nAChR cerrado, Miyazawa et al., 2003). El asa intracelular que conecta al TM3 con el TM4 es más larga y se encuentra asociada con proteínas del citoesqueleto, tales como la gefirina en el receptor a glicina (GlyR) (Kneussel and Betz, 2000) o rapsina en el receptor nicotínico para acetilcolina (nAChR) (Qu et al., 1996; Miyazawa et al., 1999). A esta gran asa se le han atribuido funciones particulares como señal de localización de los LGICs en la membrana postsináptica, así como para eventos de modulaciones funcionales.

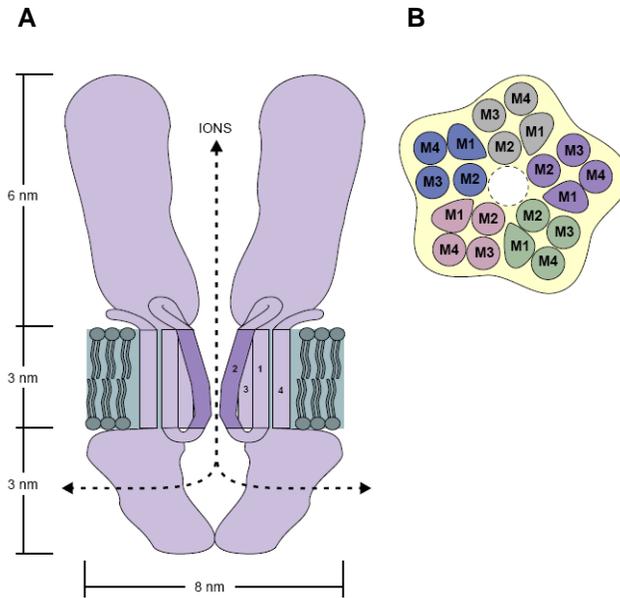


Fig. 1. Vista longitudinal y transversal de un LGIC. A) Representación esquemática de los LGICs vistos en sección longitudinal. Se muestran dos de las subunidades que comprenden al receptor. Las dimensiones aproximadas de la proteína completa están mostradas de acuerdo con la estructura cristalográfica de la proteína de unión a ACh y del receptor a ACh (Miyazawa et al., 1999; Brejc et al., 2001). Los cuatro dominios transmembranales (TM1–TM4) están enumerados, resaltando al TM2 como el formador de las paredes del canal iónico. Las líneas punteadas con flechas señalan la ruta de permeabilidad iónica propuesta de acuerdo con lo postulado para el AChR (Miyazawa et al., 1999). **B)** Esquema de los dominios TMs vistos de manera transversal a lo largo del poro en el extremo intracelular. Se muestra el arreglo terciario de los dominios TMs de un LGIC pentamérico. Los dominios TM2 se ordenan simétricamente alrededor del canal iónico. El dominio TM4 está posicionado en la periferia del canal, mientras que los dominios TM1 y TM3 están colocados en posiciones intermedias. El poro está marcado con un círculo en líneas punteadas al centro del esquema. (Tomada de *Keramidas et al., 2004*).

Aunque el pasado evolutivo preciso de los diferentes grupos de canales iónicos es desconocido, su presencia se ha generalizado prácticamente en todos los organismos llevando a cabo muchos procesos fisiológicos importantes, tales como señalización de receptores, mantenimiento del potencial de membrana en reposo (V_{rest}), acumulación y transducción de energía electroquímica, así como generación y difusión del potencial de acción. De manera similar a otras macromoléculas, estos LGICs pueden existir en varios estados: en reposo, desensibilizado, inactivado,

activado y diferentes sub-estados inducidos por varios moduladores alostéricos (Krusek et al., 2004).

Clasificación

El análisis de secuenciación de ADNc y del genoma ha revelado que en vertebrados existen tres categorías estructurales de las subunidades que conforman a los LGICs, cada subunidad ensamblada en una estructura única cuya clasificación depende del número de dominios TMs presentes, ver Figura 2 (Collingridge et al., 2009).

La **primera categoría** es la llamada superfamilia del receptor del asa-*cis*, nombrada de esta manera por los residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro (dos residuos de cisteínas separados por 13 aminoácidos), aunado al hecho de que también forman estructuras pentaméricas. Esta superfamilia incluye a los canales con “actividad excitadora” o selectivos a cationes que contemplan a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), los receptores muscarínicos, los receptores de serotonina (5-HT₃) y los canales activados por Zinc (ZAC). También están comprendidos los receptores inhibidores o selectivos a aniones como los GABA_ARs, los receptores de glicina sensibles a estriquina (GlyR) y los tres receptores cristalizados recientemente que son: el canal de cloruro activado por glutamato de *C. elegans* y los receptores bacterianos activados por ligando, *GLIC* de *Gloeobacter violaceus* y *ELIC* de *Erwinia chrysanthemi* (Collingridge et al., 2009; Sigel and Steinmann, 2012). Asimismo, se cree que por la alta homología entre estas subunidades, es posible que todas hayan evolucionado de un gen ancestral común (Le Novere and Changeux, 1995).

Con experimentos bioquímicos y estudios de mutaciones sitio-específicas llevados a cabo en los AChRs, se amplió la información sobre la estructura de los primeros LGICs descubiertos. Por consiguiente, los AChRs fueron tomados como base para el estudio de los demás miembros de la familia de estos canales. Con esto, se estableció que el dominio amino extracelular tiene aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, que incluye el sitio de unión al ligando (importante para la

función del canal) y que se localiza en la interfaz de las subunidades adyacentes (Corringer et al., 2000). Además, gracias a esto se fueron identificando más sitios de unión para otros ligandos como benzodiazepinas y anestésicos generales.

En cada miembro de la primera familia se han identificado diferentes tipos de subunidades que en acople forman receptores funcionales. Se han descrito al menos 17 genes que codifican para subunidades de los AChRs (α 1–10, β 1–4, γ , δ y ϵ), 19 genes que codifican para las subunidades de los GABA_ARs (α 1–6, β 1–3, γ 1–3, ϵ , δ , θ , π , ρ 1–3); mientras que sólo se han identificado unos cuantos genes que codifican para los receptores 5-HT₃ (5-HT_{3A–E}), GLyRs (α 1–4, β) y ZACs (solamente se ha descrito una subunidad). No todas esas subunidades se asocian aleatoriamente para formar receptores, sino que se ensamblan bajo ciertos parámetros estrictos que conllevan a la formación de una amplia gama de receptores con diferentes propiedades farmacológicas y biofísicas, así como con diferentes patrones de expresión dentro del SNC y en otros tejidos. Por ejemplo, los nAChRS expresados en la unión neuromuscular somática de animales adultos tienen la estequiometría (α 1) β 1 ϵ δ , mientras que en el músculo esquelético embrionario predomina la conformación (α 1) β 1 γ δ . Todas estas combinaciones crean objetivos específicos para el diseño de fármacos, lo que resulta de gran interés para tratar varios desórdenes nerviosos donde estas proteínas están involucradas, tales como la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, el dolor neuropático y la adicción al tabaco, entre otros (Olsen and Sieghart, 2009). En el 2005, se identificaron los homólogos procarióticos de los receptores (*asa-cis*) en vertebrados, aumentando de manera considerable esta superfamilia. Aunque no integran los residuos de cisteína canónicos, estos canales muestran aminoácidos conservados en la región del *asa-cis*, y también poseen la habilidad de formar estructuras pentaméricas (Bocquet et al., 2009; Hilf and Dutzler, 2009).

La **segunda familia** está formada por receptores catiónicos no selectivos (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) activados por glutamato (iGluRs) que incluyen: los receptores a NMDA (*N-metil-D-aspartato*), AMPA (*ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-*

isoxalepropiónico) y kainato. Cada subunidad contiene tres dominios TMs, los dos primeros separados por un asa-*p* (Lodge and Dingledine, 2000). Estos receptores forman estructuras tetraméricas (Figura 2B) y están codificados por 18 genes que se ensamblan para formar tres subfamilias: AMPA (GluA1–4), kainato (GluK1–5) y NMDA (GluN1, GluN2A–D, GluN3A, B). Adicionalmente, se descubrió una cuarta subfamilia que contempla una clase de subunidades “huérfanas” (GluD1,2), las cuales no forman receptores funcionales cuando se expresan ya sea de manera individual o en conjunto (Yuzaki, 2003). Sin embargo, se ha encontrado que las subunidades GluD2 se expresan en células de Purkinje del SNC, y una mutación (sensible a *D*-serina) en éstas –al menos en el ratón *Lurcher*–, puede ser la causa de ataxia y disfunción cerebelar (Zuo et al., 1997; Naur et al., 2007). El co-ensamble de las 3 subunidades principales dentro de, pero no entre, las familias produce un amplio número de subtipos de receptores *in vivo*. Cada subunidad del complejo tetramérico comprende un extremo amino (ATD), un dominio de unión al ligando (LBD), una región transmembranal (TMD) compuesta de tres dominios (TM1, TM2 y TM3) con un asa del poro (asa-*p*) re-entrante localizada entre los dominios M1 y M2 y un dominio carboxilo terminal (CTD). El LBD está formado por la asociación de dos dominios, D1 y D2, compuestos principalmente de segmentos peptídicos S1 y S2, respectivamente (Figura 2B). A diferencia de los receptores del asa-*cis*, los sitios de unión ortoestéricos para el glutamato se encuentran en el núcleo de cada subunidad. Clínicamente, estos receptores han sido implicados en enfermedades neurológicas como la demencia, el daño cerebral traumático y la excitotoxicidad, un fenómeno que dirige a la apoptosis neuronal en las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson (Lemoine et al., 2012).

La **tercera familia** son los llamados receptores purinérgicos P2XRs, los cuales son canales iónicos cuya actividad es excitadora, con estructura trimérica y activados por ATP, (Figura 2C, Khakh et al., 2001). Estos receptores son en su mayoría selectivos a cationes, a excepción del subtipo P2X5, el cual también conduce iones cloruro. Cada estructura está formada por el ensamble de 3 subunidades idénticas o relacionadas que poseen ambos extremos amino y carboxilo, y dos segmentos

transmembranales (M1 y M2) unidos por un ectodominio rico en cisteínas (Jarvis and Khakh, 2009). Los genes que codifican para las subunidades de los P2XRs son 7 (P2X1–7) y se han encontrado en diferentes organismos que van desde amibas y gusanos parásitos, hasta peces y mamíferos (North, 2002; Kucenas et al., 2003; Agboh et al., 2004; Fountain et al., 2007), lo cual indica que la señalización por ATP que incluye a estos receptores es un mecanismo general que se extiende más allá de lo que subyace la señalización celular en neurobiología. Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia que apoye la existencia de estos receptores en procariontes. De manera similar a la familia del *asa-cís*, los sitios de unión ortoestéricos están localizados en la interfaz de las subunidades. Actualmente los P2XRs han sido parte del desarrollo de blancos terapéuticos debido a su implicación en desórdenes como el tromboembolismo, la inestabilidad de la vejiga, el dolor y la inflamación (Burnstock, 2006; Surprenant and North, 2009).

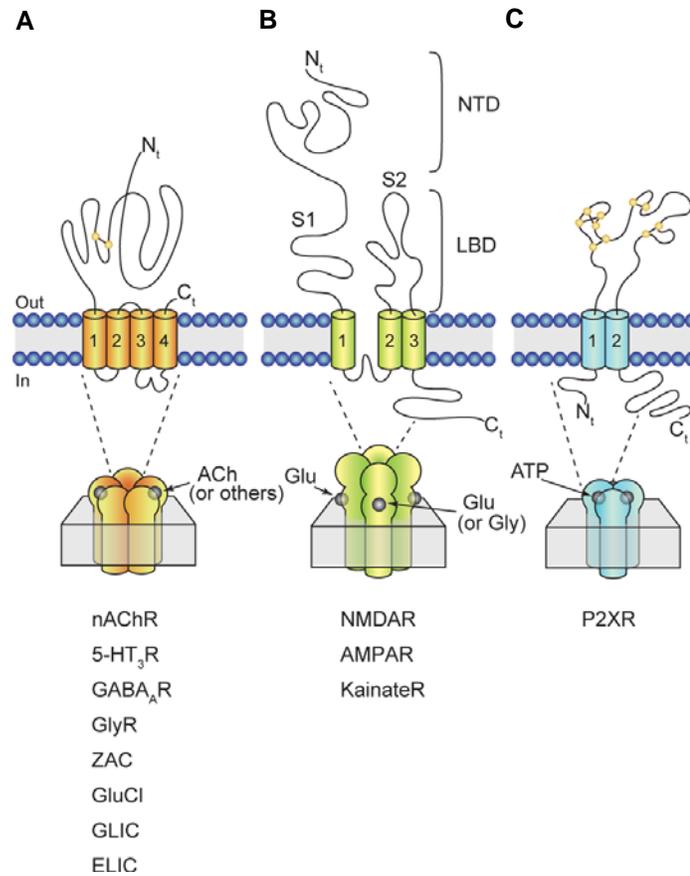


Fig. 2. Esquema de las tres categorías estructurales de los canales iónicos activados por ligando. La topografía representativa de cada categoría indica las localizaciones de los extremos intra y extracelulares, el número de segmentos TMs (cilindros enumerados) y los residuos de cisteína que participan en la formación de puentes disulfuro (círculos amarillos). **A)** Receptores del asa-*cis*, **B)** Receptores ionotrópicos activados por glutamato, y **C)** Receptores purinérgicos. (Tomada de Lemoine et al., 2012).

2. Canales iónicos activados por el GABA

La transmisión sináptica rápida se lleva a cabo por neurotransmisores que se unen a receptores postsinápticos y que inducen su apertura. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio rápido y en conjunto con el neurotransmisor excitador Glutamato, modula el balance inhibición–excitación necesario para la función apropiada en el cerebro adulto (Markram et al., 2004; Xu et al., 2011). Aunque en varios estudios de distribución del ARNm se han encontrado a los GABA_ARs en tejidos periféricos (existe evidencia que podría regular la actividad en los intestinos, los pulmones y la vejiga), sus efectos predominantes siguen siendo en el SNC (Enna and Mohler, 2007).

Actualmente, se han descrito dos tipos principales de receptores al GABA: los ionotrópicos GABA_A y los metabotrópicos GABA_B. Los primeros son canales selectivos a cloruro activados por ligando, cuyo arreglo es pentamérico, mientras que los segundos son estructuras heterodiméricas con sitios acoplados a proteínas G (Capogna and Pearce, 2011). La caracterización de estos receptores ha sido crucial para el entendimiento de las bases neurológicas de algunos desórdenes del sistema nervioso. Dada la importancia del GABA en la función del SNC, la mayoría de los trabajos sobre estos receptores arrojan mucha información que resulta relevante para la búsqueda de fármacos que traten condiciones psiquiátricas y neurológicas que recaen en estas proteínas (Wu and Sun, 2014).

Receptores ionotrópicos

Los receptores GABA_A y GABA_ρ son canales selectivos a Cl⁻ que median la inhibición sináptica rápida. Ambos receptores son parte de la superfamilia de los LGICs, específicamente de la familia del asa–cis (Connolly and Wafford, 2004; Keramidas et al., 2004).

La complejidad de los GABA_ARs recae en el hecho de que existen numerosas subunidades. Ignorando las variantes de *splicing* y las mutaciones puntuales, en vertebrados se han identificado 19 subunidades de GABA_ARs, por lo que

potencialmente existen un gran número de combinaciones distintas. Aunque los datos experimentales sugieren que no todas las combinaciones son posibles, existen algunas más comunes que otras; por ejemplo, en muchos GABA_ARs la estequiometría es 2 α :2 β : γ (Chang et al., 1996), y algo que resulta particular es que las subunidades ρ por sí mismas dan lugar a la formación de receptores GABA ρ homo-pentaméricos de manera nativa (Hackam et al., 1997). Al nivel de la secuencia de aminoácidos, dentro de una familia de subunidades existe aproximadamente un 70% de identidad, y entre miembros de diferentes familias la similitud puede ser de 20 al 50%. Los genes de las subunidades de estos receptores exhiben un patrón básico de nueve exones codificantes interrumpidos por ocho intrones, a excepción de las subunidades δ que tienen 8 exones y la subunidad γ 3 con 10 exones. Asimismo, para algunas de esas subunidades existen variantes de *splicing*, pero su función fisiológica no se ha determinado completamente. En la Figura 3 se muestra un árbol filogenético de las subunidades del receptor al GABA de humano y su localización cromosómica. La mayoría de esos genes que codifican para subunidades específicas de los receptores al GABA están organizados en 4 grupos en los cromosomas 4, 5, 15 y X del genoma humano (Darlison et al., 2005).



Fig. 3. Árbol filogenético denotando los 19 genes conocidos que codifican para subunidades del receptor GABA_A en el humano. Las subunidades están agrupadas en familias, y en colores se resaltan su localización en el cromosoma correspondiente. Las secuencias de aminoácidos fueron obtenidas de la base de datos UniProt (Wu and Nebert, 2004). El alineamiento se realizó con el software ClustalX (Thompson et al., 1997). El programa Dendroscope (Huson et al., 2007) se utilizó para realizar el dendograma. (Modificada de Sigel and Steinmann, 2012).

A esta agrupación se le ha atribuido una contribución específica en la expresión coordinada de estos genes. En general, existen dos agrupaciones con 4 genes, α_2 , α_4 , β_1 y γ_1 en el cromosoma 4; y α_1 , α_6 , β_2 y γ_2 en el cromosoma 5; y dos agrupaciones que tienen 3 genes, α_5 , β_3 y γ_3 en el cromosoma 15; y, α_3 , ϵ y θ en el cromosoma X (Darlison et al., 2005). Adicionalmente, mediante el análisis filogenético se ha considerado que la subunidad ϵ es “tipo- γ ” y la θ es “tipo- β ” (Sinkkonen et al., 2000).

Como se mencionó previamente, los GABA_ARs son proteínas multiméricas, y la mayoría de las subunidades tienen alrededor de 450 aminoácidos y además

comparten una organización topológica común, como se ilustra en la Figura 4 (Steinbach and Akk, 2011).

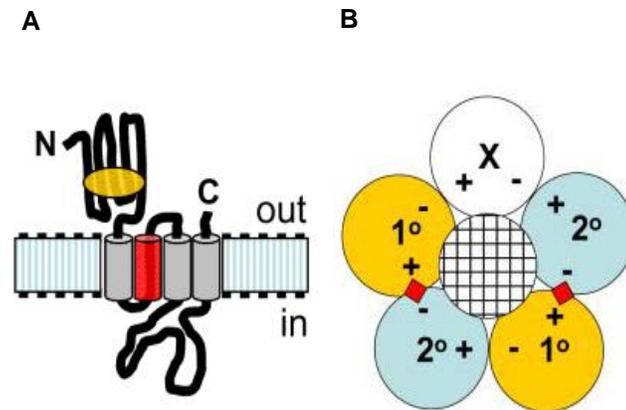


Fig. 4. Representación esquemática del arreglo pentamérico de los GABA_ARs, $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. **A)** Topología de una subunidad simple. El ovalo naranja muestra la localización aproximada del sitio de unión al GABA. El dominio TM2 (en rojo) forma la región del poro. **B)** Arreglo de las subunidades en el receptor pentamérico vista del lado extracelular. El círculo cuadrículado muestra la región central del canal iónico. En amarillo se muestran las subunidades α , en azul las subunidades β y en blanco la subunidad γ . Las subunidades que contribuyen al lado primario (positivo, +) del sitio de unión al GABA se identifican con el número 1, mientras que las subunidades que contribuyen con el lado complementario están señaladas con el número 2. La quinta subunidad estructural (γ) identificada como "X" en conjunto con la subunidad α proveen un sitio de unión para benzodiazepinas. (Tomada de Steinbach and Akk, 2011).

Cada subunidad consiste de un dominio amino terminal extracelular hidrofílico que contiene el asa-*cis*, seguido por los 4 dominios transmembranales (TM1–TM4). El TM2 forma el poro del receptor, y entre los dominios TM3–TM4 se localiza un asa intracelular de gran tamaño involucrada en fenómenos de modulación por fosforilación, además de funcionar como sitio de interacción con otras proteínas. A esta asa se le ha reconocido principalmente como una región de la proteína que cumple funciones importantes en el tráfico del receptor, y en el anclaje de los receptores al citoesqueleto y en la membrana postsináptica (Chen and Olsen, 2007; Jacob et al., 2008).

Como en otros receptores del asa-cis, el sitio de unión al ligando está construido de 6 regiones llamadas asas (A-F). En el GABA_AR se han llevado a cabo estudios que revelan que los residuos críticos para el sitio de unión son de tipo aromáticos (α 1Phe⁶⁴, β 2Tyr⁶², β 2Tyr⁹⁷ y β 2Tyr²⁰⁵), hidroxilados (α 1, β 2Thr¹⁶⁰, β 2Thr²⁰², β 2Ser²⁰⁴ y β 2Ser²⁰⁹) y residuos cargados (α 1Arg¹²⁰, α 1Asp¹⁸³, α 1Arg⁶⁶) (Newell and Czajkowski, 2003; Wagner et al., 2004). De manera similar, en los receptores GABA _{ρ} , varios aminoácidos con diferentes propiedades han sido identificados como parte importante para ese sitio de unión al ligando; estos incluyen Tyr¹⁰², Arg¹⁰⁴, Tyr¹⁰⁶, Phe¹³⁸, Val¹⁴⁰, Arg¹⁵⁸, Tyr¹⁹⁸, Phe²⁴⁰, Thr²⁴⁴ y Tyr²⁴⁷ (Lummis et al., 2005; Sedelnikova et al., 2005; Harrison and Lummis, 2006).

Es importante notar que las diferentes subunidades confieren propiedades específicas al receptor, generando un mejor entendimiento del control de la estequiometría de cada subunidad y de los patrones de expresión de diferentes subunidades, especialmente porque los GABA_ARs son un importante blanco terapéutico (Lummis, 2009). En teoría, un gran número de GABA_ARs se pueden encontrar en una sola célula; en algunos casos, hasta más de 8 isoformas se han identificado en la misma célula. Además, el *splicing* alternativo y los eventos de edición del ARNm han contribuido a tener una gran diversidad de estos receptores. La composición estructural más abundante está conformada de subunidades α 1, β 2 y γ 2 (Jacob et al., 2008). Lo que aún permanece en discusión es cuántas de esas isoformas pueden estar expresadas de manera natural y funcional. Las subunidades de GABA_ARs (al menos en rata) han sido localizadas en el SNC con el uso de anticuerpos específicos. Algunas de ellas tienen alta expresión a lo largo del SNC, otras muestran expresión reducida. Por ejemplo, la subunidad α 6 sólo se encuentra expresada en células granulares cerebelares, y la subunidad ρ tiene una distribución que se restringe particularmente a la retina (Sieghart and Sperk, 2002). Fuera del SNC, los GABA_ARs se han encontrado en el hígado, el músculo liso de pulmón y en varios tipos de células inmunes (Bjurstom et al., 2008; Mizuta et al., 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, 5 de las 19 isoformas existentes forman un complejo–receptor con un poro central, y aunque las mismas subunidades contribuyen a la formación del canal, el arreglo estequiométrico puede variar. Mientras que las subunidades α , β y γ parecen combinarse en una conformación definida, las subunidades ε y δ tienen propiedades de ensamblaje heterogéneas (Tretter et al., 1997; Bollan et al., 2008; Baur et al., 2009; Kaur et al., 2009). Las características de los receptores dependen de la composición de subunidades y de su arreglo estequiométrico, lo cual lleva a 30 posibilidades de ensamble entre las subunidades para construir un receptor pentamérico a partir de sólo 3 tipos de subunidades (Figura 5) (Minier and Sigel, 2004).

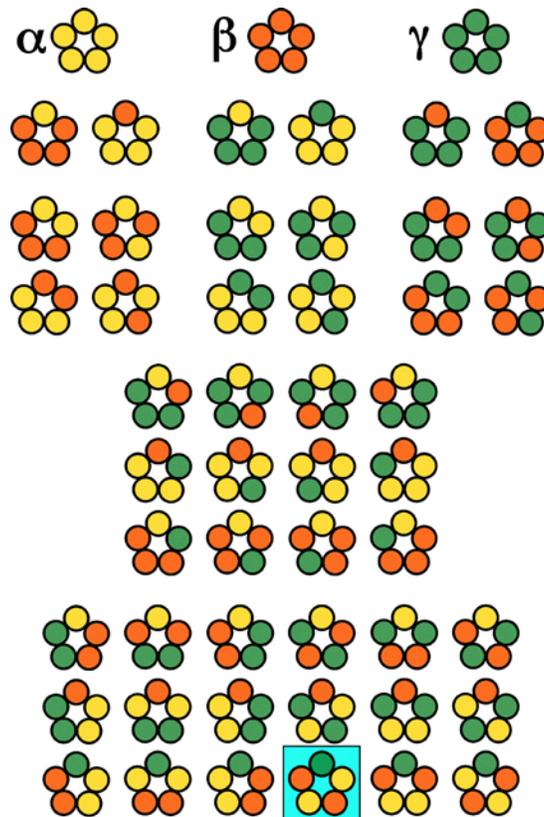


Fig. 5. Posibles combinaciones de subunidades en un arreglo pentamérico a partir de tres subunidades distintas, α (amarillo), β (rojo) y γ (verde). Las diversas posibilidades arrojan tres receptores homoméricos, 18 receptores compuestos de dos subunidades y 30 receptores compuestos de 3 subunidades diferentes. El receptor resaltado en un cuadro azul representa el consenso actual de la disposición de las subunidades en receptores GABA_A $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ vistos desde el exterior celular. (Tomada de Sigel and Steinmann, 2012).

Afortunadamente, muchas de esas suposiciones sobre el arreglo pentamérico del canal, y demás propiedades de los GABA_ARs, se han ido esclareciendo con la reciente estructura cristalográfica del homopentámero GABA_AR- β 3_{cryst} (Miller and Aricescu, 2014). Esta estructura determinada a 3 Å de resolución mostró un receptor que se asemeja a un cilindro de 110 Å de altura con un diámetro que va de los 60 a los 80 Å, incrustado en la membrana plasmática y que sobresale aproximadamente unos 65 Å en el espacio extracelular (Figura 6).

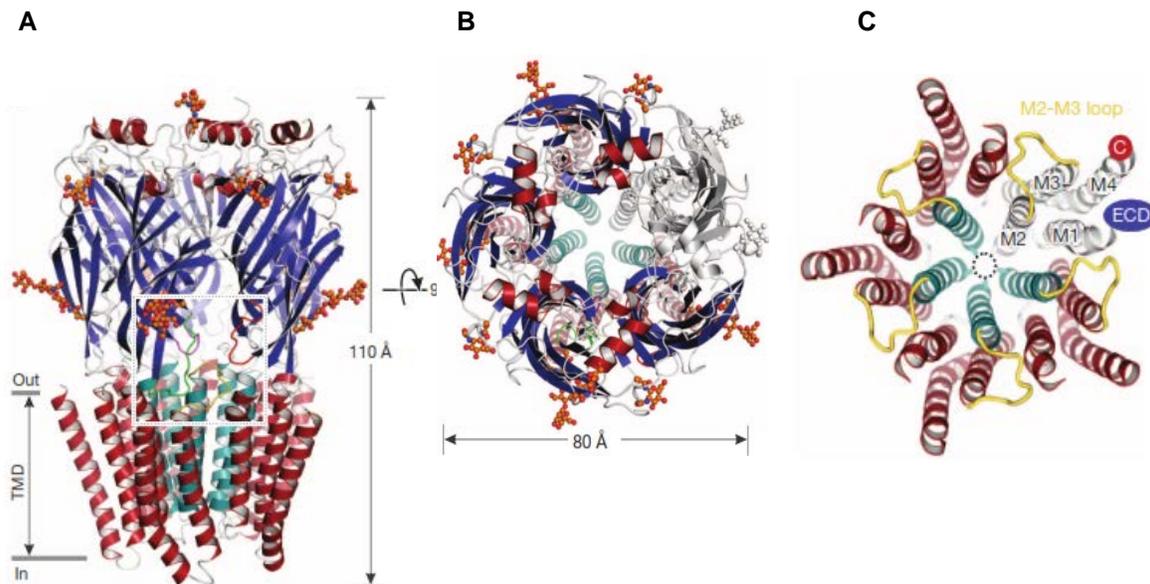


Fig. 6. Arquitectura del homopentámero GABA_AR- β 3_{cryst}. **A)** Vista paralela a la membrana plasmática. Las α -hélices se muestran en rojo, a excepción del dominio TM2 que forma el poro y que está resaltado en color turquesa; las hojas β están en color azul; y las diversas asas se ilustran en color gris. Los glicanos unidos al extremo amino están representados en esferas pequeñas de color naranja. **B)** Vista desde el espacio extracelular (hendidura sináptica). Se puede observar que la proteína tiene un diámetro \sim 80 Å. **C)** Región transmembranal pentamérica. Se ilustra el arreglo de las hélices M1-M4 y la gran asa M3-M4 (en color amarillo). El poro central se denota con un círculo punteado. (Tomada de Miller and Aricescu, 2014).

Con la estructura cristalizada de un GABA_AR homomérico, el panorama sobre las transiciones conformacionales que ocurren en los LGICs pentaméricos se amplía, y da una base racional para el entendimiento de cómo diversas mutaciones afectan el ensamble de estos receptores, y por consiguiente su papel en las enfermedades

asociadas a estos. Asimismo, se extiende la información acerca de la unión del agonista, de las diversas modificaciones postraduccionales que se llevan a cabo, la transducción de señales, así como también el proceso de apertura y cierre del canal (Miller and Aricescu, 2014).

Finalmente, si bien los receptores GABA ρ se han considerado como una subfamilia de los GABA A Rs, estos son bioquímica-, farmacológica- y fisiológicamente diferentes. Y aunque ambos pueden ser activados por el GABA, en los receptores GABA ρ existe una mayor afinidad por el ligando principal. Además, mientras que para el receptor GABA A existen muchos potenciadores endógenos (neuroesteroides) y exógenos (benzodiazepinas, barbitúricos, anestésicos generales y alcohol), en los receptores ρ no se ha encontrado modulación alguna por estas sustancias. Tampoco la bicuculina tiene efecto sobre ellos; sin embargo, son antagonizados selectivamente por el ácido metilfosfínico (TPMPA) y activados por el c-ACA. Sus propiedades funcionales también son diferentes; por ejemplo, tienen una cinética de activación y desactivación más lenta que los receptores GABA A , aunado al hecho de que no muestran desensibilización (Johnston, 1996; Steinbach and Akk, 2001; Akk et al., 2010). Aunque existen diferencias entre ellos, la división entre receptores GABA A y el GABA ρ sigue siendo difícil de establecer, pues en el 2004 se encontró que la subunidad ρ en el tallo cerebral se puede co-expresar con las subunidades $\alpha 1$ y $\gamma 2$, dando origen a receptores nativos con propiedades mezcladas (Milligan et al., 2004).

Receptores metabotrópicos

A diferencia de los anteriores, estos receptores formados por 7 dominios TMs ejercen sus efectos a través de las subunidades G α y G $\beta\gamma$ de las proteínas G (familia 3 o familia C). Desafortunadamente, las consecuencias fisiológicas de su modulación son poco entendidas, pero sus efectos están vinculados a factores de transcripción, cinasas de proteínas y señalización de Ca $^{2+}$ intracelular (Couve et al., 2002; Ren and Mody, 2003; Martin et al., 2004). Actualmente la diversidad molecular bien establecida consiste de dos isoformas GABA $\text{B}1$ (GABA $\text{B}1\text{A}$ y GABA $\text{B}1\text{B}$), las

cuales se ensamblan con las subunidades GABA_{B2} para generar receptores heterodiméricos (Bettler and Tiao, 2006). En comparación con la señalización dada por la subunidad G α , la mediada por G $\beta\gamma$ está mejor estudiada. Los efectores principales dependientes de G $\beta\gamma$ de los receptores GABA_B presinápticos son los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo N y P/Q (Chen and van den Pol, 1998; Bussieres and El Manira, 1999; Barral et al., 2000). Los receptores GABA_B inhiben esos canales de calcio en las terminales inhibitoras y excitadoras, restringiendo la liberación del neurotransmisor. Los autoreceptores GABA_B inhiben la liberación del GABA, mientras que los heteroreceptores GABA_B disminuyen la liberación de otros neurotransmisores (por ejemplo, el glutamato, la dopamina, la adrenalina, o la serotonina). También, dependiendo de si la terminal libera un neurotransmisor inhibitor o excitador, los GABA_BRs presinápticos incrementan o disminuyen la excitabilidad de la neurona postsináptica; es decir, restringen la liberación del neurotransmisor, no sólo a través de la inhibición de los canales de calcio sino también por retardar el reclutamiento de las vesículas sinápticas (Sakaba and Neher, 2003). Asimismo, hay evidencia adicional que sugiere que estos receptores presinápticos se acoplan a canales de K⁺ rectificadores entrantes tipo Kir3 para inhibir la liberación de glutamato (Ladera et al., 2008; Fernández-Alacid et al., 2009).

La identificación de los GABA_BRs ha requerido de estimulación de fuerte intensidad debido a que están localizados a mayor distancia de los sitios de liberación, necesitando una gran cantidad del ligando endógeno principal (liberado sinápticamente) para ser activados (Scanziani, 2000). Farmacológicamente, estos receptores son selectivamente activados por el baclofen, el GHB o el Fenibut, y bloqueados por el faclofeno, así como algunos análogos del ácido fosfónico y sulfónico. Adicionalmente, los GABA_BRs producen señales inhibitoras prolongadas y lentas modulando la liberación de neurotransmisores. A grandes rasgos, los estudios relacionados con estos receptores van orientados a entender la asociación de más subunidades que modulen el receptor, resaltando las propiedades cinéticas y farmacológicas en un intento de descifrar el sistema de los GABA_BRs (Pinard et al., 2010).

Como se describió previamente, los receptores GABA_A y GABA_B difieren estructuralmente y en sus mecanismos de señalización, pero pueden estar estrechamente acoplados funcionalmente. Hay evidencia experimental de que la subunidad γ 2S de los GABA_ARs puede formar un complejo con las subunidades R1 de los GABA_BRs, incrementando su tráfico hacia la membrana plasmática cuando la subunidad R2 está ausente, la cual usualmente se requiere para el transporte eficiente de las subunidades R1 a la superficie celular. La subunidad γ 2S también forma complejos al mismo tiempo con las subunidades R1 y R2 para permitir la internalización del receptor inducida por el agonista (Balasubramanian et al., 2004).

3. El GABA como neurotransmisor excitador

Retomando la información anterior, los GABA_ARs son generalmente canales iónicos activados por el GABA selectivos a Cl⁻, con cierta permeabilidad a iones bicarbonato (Kaila et al., 1989). En el complejo pentamérico $\alpha\beta\gamma$, que es el mejor estudiado, la unión del agonista ocurre en dos sitios localizados entre la interfaz α/β , los cuales aparentemente tienen diferentes afinidades para el agonista y por consiguiente, para la apertura del canal. Tras la unión del ligando al sitio de interacción, el receptor sufre cambios conformacionales que aseguran al GABA en el sitio de unión, esto conlleva a que la proteína altere su conformación y entre en uno o varios estados cerrados que se han denominado “*flipped states*”. Posteriormente, estos cambios conducen a la apertura del poro de permeación; y en ciertas ocasiones, el canal puede permanecer en varios estados cerrados incluso cuando el ligando sigue unido (Wagner and Czajkowski, 2001; Lape et al., 2008). En el momento en que el GABA se une a esos receptores en el sitio postsináptico, el canal iónico se abre y el cloruro difunde hacia el interior celular en favor de su gradiente de concentración, llevando a una hiperpolarización de la neurona madura postsináptica y finalmente a la inhibición (Luján et al., 2005).

Actividad excitadora en vertebrados

Aunque el GABA ha sido conocido en gran medida por su acción hiperpolarizante e inhibición sináptica, hay estudios donde se ha mostrado que tiene acciones despolarizantes en el tejido neural (durante el desarrollo). Hace años, tras diversos estudios farmacológicos realizados en procesos de despolarización aferente primaria espinal (Eccles et al., 1963), se propuso que el GABA tenía una acción despolarizante y excitadora. Esta despolarización también fue observada en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD), células que dan lugar a las fibras aferentes primarias (Gallagher et al., 1978). Igualmente, se demostró que este neurotransmisor podía tener una acción excitadora en neuronas inmaduras del SNC (Obata et al., 1978), las cuales posteriormente se convertían en neuronas adultas con una actividad inhibitoria bien establecida.

Para explicar esas acciones despolarizantes del GABA, se han propuesto tres mecanismos: 1) en neuronas fetales los niveles de cloruro intracelular son lo suficientemente altos para que el anión fluya hacia el exterior celular a través de los GABA_ARs, causando despolarización (Ben-Ari et al., 1990; Cherubini et al., 1991); 2) en neuronas hipocampales adultas la activación de los receptores al GABA causa una salida de iones bicarbonato debida a un colapso del gradiente de cloruro y por tanto produce una despolarización (Kaila et al., 1997; Perkins, 1999); 3) otros estudios, principalmente en invertebrados, han sugerido que el GABA podría mediar la excitabilidad a través de corrientes entrantes catiónicas (Norekian, 1999; Goldmakher and Moss, 2000; Swensen et al., 2000; Beg and Jorgensen, 2003; Gisselmann et al., 2004).

En las neuronas inmaduras del SNC y en las células del GRD, el potencial de inversión de las respuestas al GABA (E_{GABA}) es positivo con respecto al potencial de membrana en reposo (V_{rest}) y al umbral del potencial de acción. Tomando en cuenta que los GABA_ARs son principalmente permeables a cloruro, las acciones despolarizantes del GABA tienden a ser explicadas a partir del E_{Cl^-} , el cual es menos negativo que el V_{rest} . Lo anterior lleva a la siguiente interrogante, ¿Cómo se llevan a cabo esos efectos del GABA? Hace algunos años se identificó una familia de co-transportadores de cloruro-cationes que controlan en gran medida el gradiente de cloruro en las neuronas y que a su vez dictan las acciones del GABA (Delpire, 2000; Sung et al., 2000; Ben-Ari, 2002; Owens and Kriegstein, 2002). El co-transportador $Na^+-K^+-Cl^-$ (NKCC1), el cual es controlado por los gradientes de sodio y de potasio, incrementa la concentración intracelular de cloruro. La presencia de los NKCC1 en las células del GRD y en neuronas inmaduras del SNC puede explicar que el E_{Cl^-} sea despolarizante (Delpire, 2000). En contraste, el co-transportador K^+-Cl^- (KCC2) acopla el transporte de cloruro al gradiente del potasio y normalmente, disminuye la concentración intracelular del cloruro $[Cl^-]_i$, más que la dictada por la distribución pasiva. Varios estudios han mostrado que KCC2 disminuye la $[Cl^-]_i$ en neuronas del SNC debido a una regulación a la alta de este

transportador y a la disminución en la expresión de NKCC1 (Figura 7) (Plotkin et al., 1997).

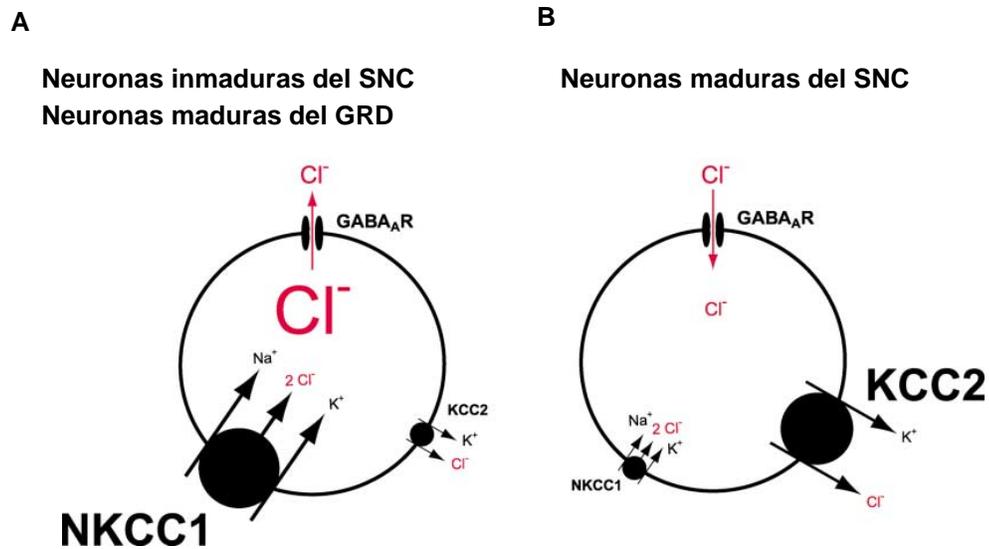


Fig. 7. Homeostasis del cloruro de neuronas en desarrollo y maduras. A) Las neuronas inmaduras del SNC y las células maduras del GRD expresan principalmente el co-transportador NKCC1 y en menor medida el KCC2. Esto conlleva a una alta concentración intracelular de Cl^- y, por tanto, la activación de los GABA_ARs provoca una salida de cloruro que conduce a la despolarización. **B)** En neuronas del SNC maduras la expresión de NKCC1 disminuye y la de KCC2 aumenta. Esto lleva a una baja $[\text{Cl}^-]_i$; provocando que la activación del GABA_AR genere un ingreso del anión, lo que termina en una hiperpolarización de la neurona. (Modificada de Stein and Nicoll, 2003).

Por otro lado, Gullledge y Stuart mostraron que el GABA tiene acciones excitadoras bien definidas en células corticales piramidales maduras y que dependen críticamente del potencial de membrana en reposo, así como de la localización y tiempo de la entrada GABAérgica. Es decir, cuando se estimula con el GABA a nivel dendrítico (85–685 μm lejos del soma) se facilita la generación de potenciales de acción, que dependen también del tiempo en el que ocurre la estimulación. Sin embargo, mientras la entrada GABAérgica se efectúa más cerca del soma, predomina el efecto inhibitor (Figura 8) (Gullledge and Stuart, 2003).

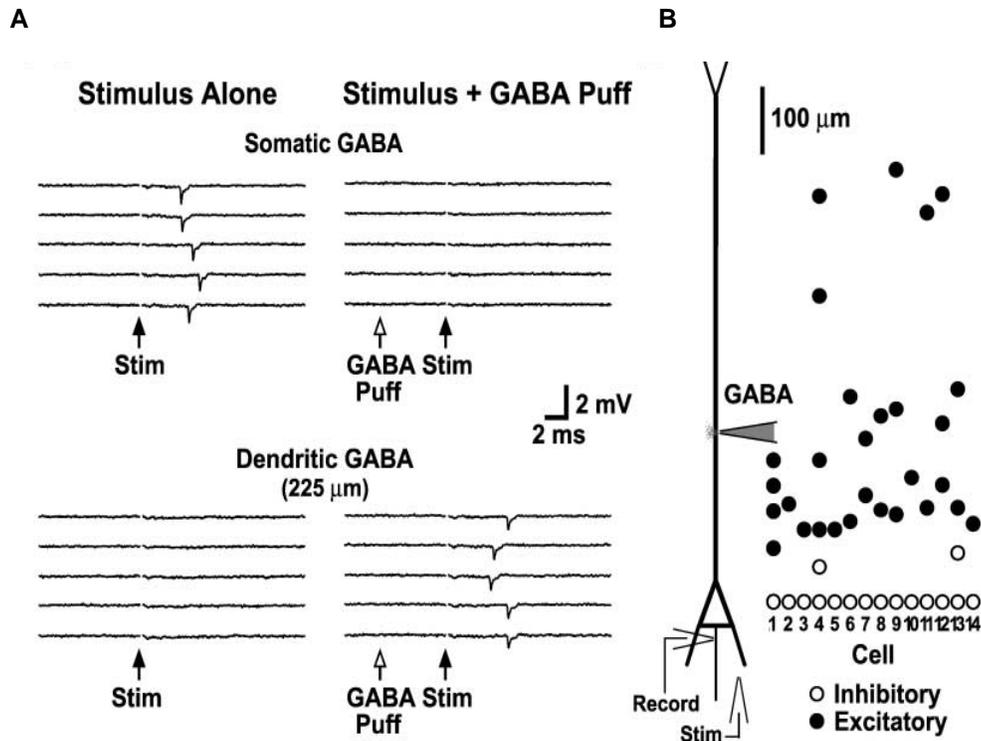


Fig. 8. La aplicación del GABA a nivel dendrítico puede ser excitadora. A) Registros extracelulares muestran que la aplicación somática del GABA bloquea la iniciación de potenciales de acción (PA) en respuesta a estímulos supraumbrales (panel superior), mientras que la aplicación del GABA al nivel dendrítico promueve la generación de PA cuando se producen sub- y supraumbrales (panel inferior). **B)** Registros extracelulares que identifican sitios donde el GABA puede ser excitador (●) o inhibitorio (○). (Tomada de Gullledge and Stuart, 2003).

El concepto de la acción excitadora del GABA durante el desarrollo temprano se basa en datos obtenidos principalmente de registros en rebanadas de cerebro. La aparente acción despolarizante de este neurotransmisor parece provenir del daño celular debido al procedimiento de rebanado, el cual dirige a la acumulación intracelular de Cl^- en neuronas dañadas, es decir, mas que una acción real, se convierte en un artefacto (Bregestovski and Bernard, 2012). Sin embargo, muchos de los estudios que reportan estas acciones dan por hecho que todo se realizó bajo un estricto control.

También hay evidencia de que durante condiciones patológicas el E_{GABA} puede llegar a ser despolarizante (quizá por situaciones donde las células terminan

dañadas, incrementando su concentración de cloruro) contribuyendo a la actividad que se da entre episodios epilépticos en la epilepsia del lóbulo temporal (Cohen et al., 2002). Todos estos hallazgos en conjunto demuestran que el control de la excitabilidad de neuronas maduras del SNC es mucho más complejo de lo que se pensaba.

Actividad excitadora en invertebrados

Como se ha visto, al menos en vertebrados, el GABA puede fungir como neurotransmisor excitador, que es meramente dependiente de los cambios en la homeostasis del Cl^- . Por otro lado, en invertebrados exclusivamente, hay evidencia que muestra cómo el GABA también tiene actividad excitadora, pero que es independiente de los factores descritos previamente (Figura 9).

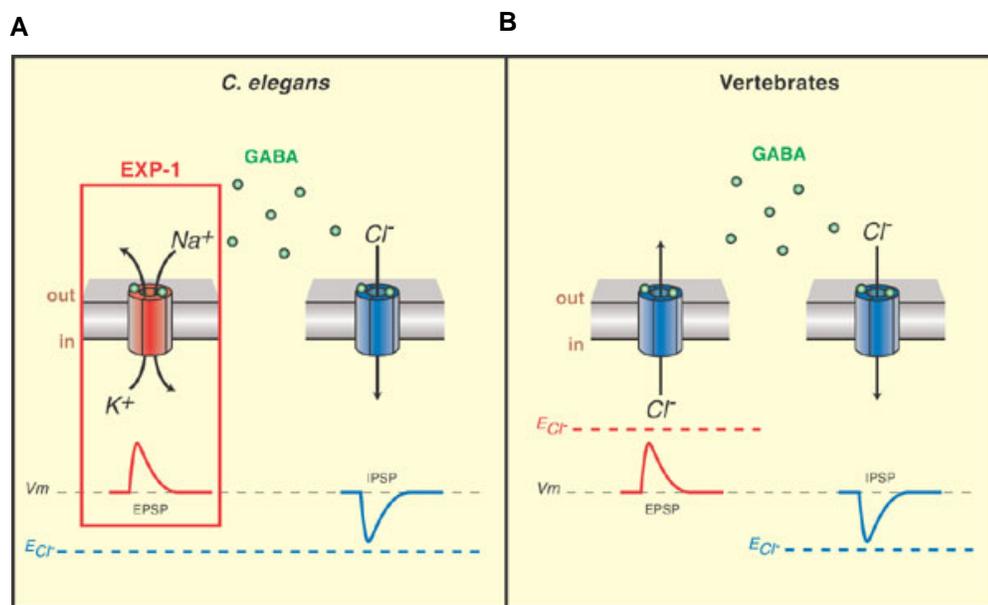


Fig. 9. Mecanismos que subyacen a las acciones inhibitorias y excitadoras del GABA en *C. elegans* y en vertebrados. A) En el nematodo *C. elegans*, las respuestas despolarizantes del GABA son mediadas por la presencia de receptores con selectividad catiónica. **B)** En vertebrados los cambios en el E_{Cl^-} generan excitabilidad definida por el GABA. E_{Cl^-} , potencial de equilibrio al Cl^- ; EPSP, potencial postsináptico excitador; IPSP, potencial postsináptico inhibitorio; V_m , potencial de membrana. (Tomada de Goillard and Marder, 2003).

Beg y Jorgensen en el 2003 mostraron por primera vez evidencia de que existen conductancias catiónicas activadas por el GABA mediando las acciones excitadoras de este neurotransmisor en el nematodo *C. elegans* (Beg and Jorgensen, 2003). Tal hallazgo sorprendió a muchos neurocientíficos que suponían comúnmente que las acciones del GABA en el SNC adulto se restringían a un efecto inhibitor. Estos autores clonaron una subunidad que llamaron EXP-1, que al ser expresada en un sistema heterólogo resultó ser formadora de un canal iónico activado por el GABA selectivo a cationes, el cual se ha descrito como mediador de la contracción muscular entérica en *C. elegans*. EXP-1 está localizado en la unión neuromuscular y posee los aminoácidos de interacción con el GABA como los encontrados en las subunidades α y β , pero que difiere de todas las subunidades de los GABA_ARs al nivel del dominio TM2, el cual forma el poro del canal y determina la selectividad iónica (Wotring et al., 2003). Como se muestra en la Figura 10A, cuando EXP-1 se expresa en ovocitos de *Xenopus* y se le aplica el GABA, es posible evocar una corriente entrante de gran amplitud con un V_{rev} cercano a 0 mV, el cual es afectado cuando las concentraciones externas de Na⁺ y K⁺ son alteradas, pero no por la modificación en la concentración externa de Cl⁻ (Figura 10B-C).

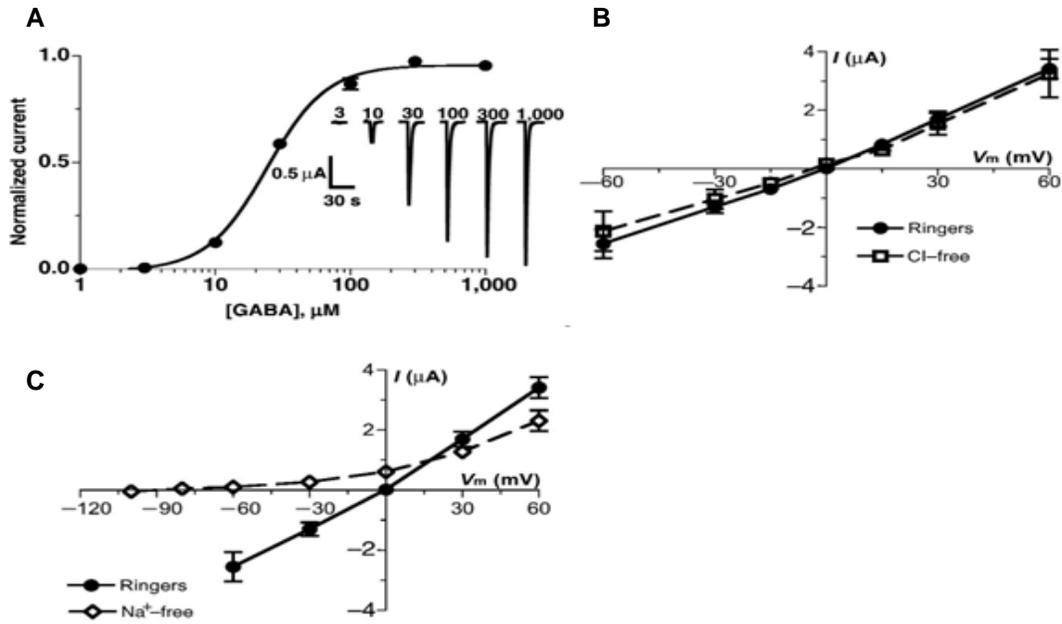


Fig. 10. EXP-1 es un canal catiónico activado por el GABA. A) Curva concentración–respuesta del GABA. **B)** y **C)** Selectividad iónica del receptor homomérico. El desplazamiento del V_{rev} en ausencia de Na^+ sugiere que éste es el catión primario que fluye por el receptor. (Tomada de Beg and Jorgensen, 2003).

Farmacológicamente, este receptor es modulado por agonistas de los GABA_ARs como el muscimol, pero no es bloqueado por la PTX. Al nivel molecular, la subunidad EXP-1 contiene los determinantes moleculares necesarios para la selectividad catiónica, carece de la Pro en la posición -2', contiene un Glu cargado negativamente en el anillo intermedio y finalmente, una Phe en la posición 13', la cual es de naturaleza similar al residuo de valina hidrofóbico presente en los canales selectivos a cationes (Figura 12).

Otro ejemplo en invertebrados donde el GABA actúa como neurotransmisor excitador viene del análisis de la expresión heteróloga, esta vez de péptidos de la mosca *D. melanogaster*. El conocimiento acerca de la estructura y función de los receptores al GABA ionotrópicos en *Drosophila* es parcial, se conocen ampliamente los receptores RDL y LCCH3 (homólogo de un canal de Cl^- activado por ligando) que han sido blancos de insecticidas, otros no han sido estudiados a gran detalle, tal es el caso de una subunidad adicional que fue clonada (GRD: receptor tipo-

GABA/Glicina), la cual muestra una homología considerable con respecto a los GABARs ionotrópicos. En un intento de probar si la combinación de estas subunidades formaba receptores funcionales, se encontró un nuevo tipo de canal heteromultimérico activado por el GABA, conformado por las subunidades GRD y LCCH3 (Figura 11A). Al igual que en EXP-1, esta combinación de subunidades al ser expresada en ovocitos de *Xenopus* resultó en un canal que respondió al GABA y al muscimol, con una considerable dependencia al Na⁺ (Figura 11B–D) (Gisselmann et al., 2004).

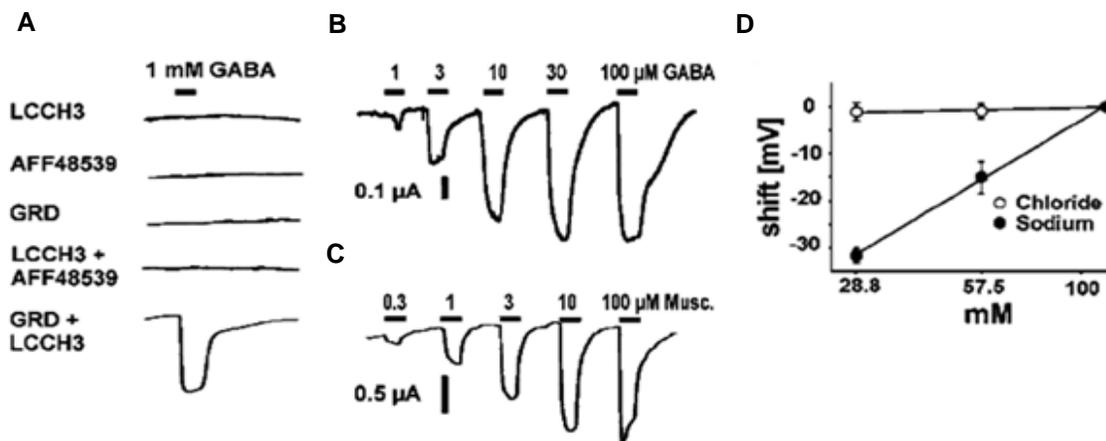


Fig. 11. Propiedades electrofisiológicas del receptor heteromultimérico GRD/LCCH3 activado por el GABA selectivo a cationes. **A)** Análisis de la expresión de subunidades de receptores al GABA (solos o en co-expresión). **B)** y **C)** Corrientes evocadas por el GABA y el muscimol en el receptor GRD/LCCH3. **D)** Desplazamientos del V_{rev} en experimentos donde se disminuyen las concentraciones de los iones principales permeantes, las corrientes registradas muestran dependencia al Na⁺. (Tomada de Gisselmann et al., 2004).

El receptor heteromérico de *Drosophila* comprueba la existencia de un LGIC activado por el GABA y con actividad despolarizante, distinto al encontrado en *C. elegans* (con apenas un 21% de homología). Molecularmente, lo que causa este comportamiento en la co-expresión es que la subunidad GRD (posiciones -2', -1' y 13') tiene mayor similitud con los canales activados por ligando con selectividad catiónica. Por otro lado, la subunidad LCCH3 carece de una prolina en la posición -2' (en canales selectivos a aniones) pero no muestra aminoácidos cargados en la

posición -1' (Figura 12). Por tanto, la subunidad GRD parece ser la determinante de la selectividad catiónica, considerando la base molecular de que ciertos aminoácidos en posiciones específicas determinan las propiedades de selectividad de un receptor (Wotring et al., 2003).

	M2							
	-2'	1'	5'	10'	15'	20'		
GABA-R1	SFWIDRRAV	PARVPLGITT	VLTMTSTI	ITGVNAS			anion selective	
RDL	SFWINRDAV	PARVALGVTT	VLTMTLSS	SGSRAS			anion selective	
LCCH3	SFWINHEAT	SARVALGITT	VLTMTIIST	GVRSS				
GRD	SFWLNREAT	ADRVSLGITT	VLTMTFLGLE	ARTD				
AFF48539	SFWIHREAT	SDRVSLCVTS	VLTLSLIS	LDSRTD				
EXP-1	SLWMETET	EFQDM-ISI	ILAITFLIFS	SYNEM			cation selective	
5HT3	GFYLPNSG	ERVSFKIT	LLLGYSVFLI	IIVSDT			cation selective	
ACH	VFLLPADSG	EKISLGITV	LLSLIVFEM	LLVAEI				

Fig. 12. Comparación de las secuencias en la región del dominio TM2 de subunidades de receptores con selectividades aniónicas y catiónicas. En los recuadros se resaltan las determinantes moleculares que definen el comportamiento iónico. GABA-R1, receptor GABA_ρ de rata; RDL, Canal de Cl⁻ activado por ligando en *D. melanogaster*; LCCH3, homólogo de un canal de Cl⁻ activado por ligando en *Drosophila*; GRD, receptor tipo-GABA/Glicina de *Drosophila*; AFF48539, subunidad que se ajusta al grupo de los GABA_ARs de *Drosophila*; EXP-1, receptor homooligomérico selectivo a cationes activado por el GABA de *C. elegans*; 5HT3, receptor para serotonina de rata; ACh, receptor ionotrópico para acetilcolina de rata. (Tomada de Gisselmann et al., 2004).

Es importante recalcar que el GABA no es el primer neurotransmisor con actividad dual operando canales selectivos a cloruro o a cationes en invertebrados; es decir, que funciona como excitador o inhibidor. Por ejemplo, la acetilcolina y el glutamato pueden activar conductancias aniónicas y catiónicas en invertebrados (Lingle and Marder, 1981; Kehoe and Vulpius, 2000), mientras que en vertebrados esas sustancias están restringidas a operar exclusivamente conductancias catiónicas. Esto lleva a la cuestión de si los canales de cloruro activados por ACh y glutamato, además de los descritos en *C. elegans* y en *D. melanogaster*, han desaparecido durante la evolución. Tal evidencia sobre las acciones excitadoras del GABA nos recuerda que la acción de un neurotransmisor no está determinada por su identidad, sino por la naturaleza del receptor que activa.

4. Receptores homoméricos activados por el GABA

De entre los 19 genes existentes que codifican para las subunidades de los GABA_ARs, al menos en vertebrados, las subunidades $\rho 1-3$ son las únicas capaces de formar receptores funcionales homoméricos nativos sin requerir del acople con otras. Estos receptores han resultado de particular interés porque sus propiedades farmacológicas y cinéticas son notablemente diferentes de los receptores compuestos por las demás subunidades (Johnston et al., 2010).

Por otro lado, se ha podido comprobar que las subunidades $\beta 3$ pueden formar eficientemente receptores homoméricos que funcionan de manera similar a un receptor heteromérico (Miller and Aricescu, 2014). Además, estas subunidades se han descrito como determinantes de la selectividad iónica en un GABA_AR común (Jensen et al., 2002). Sin embargo, no se ha comprobado que este receptor homomérico- $\beta 3$ pueda existir de manera funcional en las células, y aunque se han identificado poblaciones discretas en el cerebro, sigue sin ser claro si tienen alguna participación especial (Yip et al., 2013). Debido a la ausencia de información –hasta hace apenas unos años– sobre la estructura de los GABA_ARs, todas las aproximaciones estructurales recaían en analogías con los AChRs que no podían explicar adecuadamente todas las propiedades encontradas en los GABA_ARs. Por tanto, aunque estos homómeros- $\beta 3$ no existan de manera nativa, han resultado ser la herramienta más acertada para el estudio de los GABA_ARs.

Los receptores homoméricos activados por el GABA suelen ser más afines al ligando principal en comparación con los heteroméricos; es decir, mientras que los GABA_ARs comunes poseen dos sitios de unión al GABA (entre las subunidades α y β), en aquellos formados por una sola subunidad parecen existir 5 sitios de unión (Figura 13) (Sedelnikova et al., 2005).

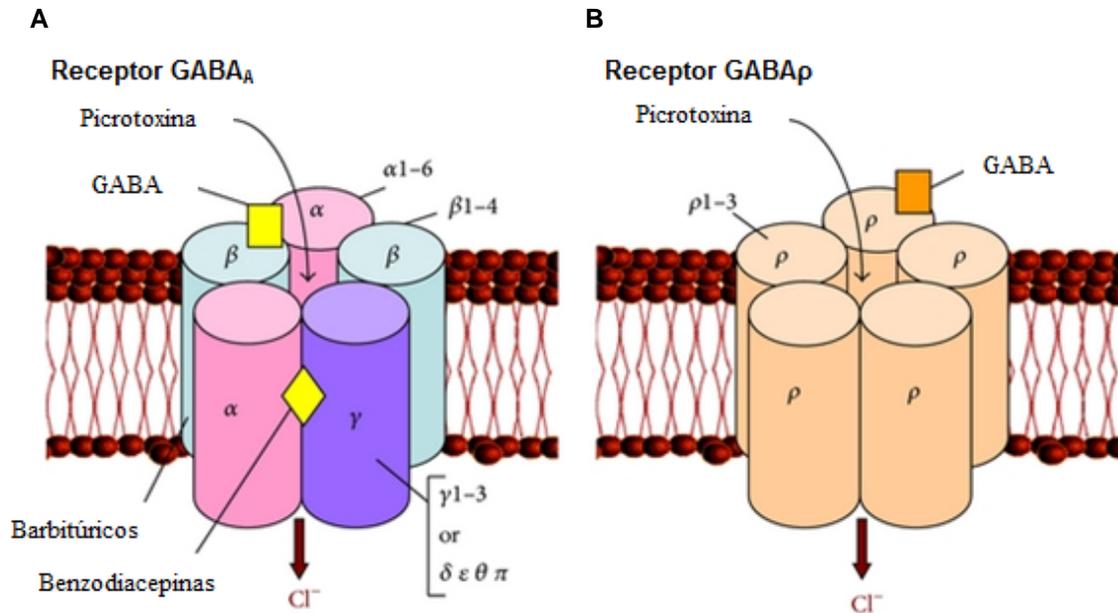


Fig. 13. Representación esquemática de los receptores al GABA ionotrópicos. Estos receptores están constituidos por cinco subunidades formando un poro selectivo para aniones. **A)** Composición estructural de los GABA_ARs. **B)** Arreglo estructural ilustrativo para los receptores homoméricos GABA_ρ. Los sitios de unión al GABA, moduladores como barbitúricos y BZP, así como a antagonistas (PTX) se encuentran indicados en el esquema. (Modificada de Popova, 2014).

El sitio de unión al agonista está compuesto por 6 asas discontinuas (A–F). El ligando se une entre las asas A, B y C de la subunidad principal “α”; y en las asas D, E y F de la subunidad complementaria “β” (Figura 14). Muchos residuos involucrados en la unión del agonista principal con los receptores (GABA_A y GABA_ρ) de vertebrados se han encontrado dentro de las asas extracelulares, lo que llevó a la determinación de que estos residuos son de naturaleza aromática, hidroxilos y cargados positiva– o negativamente (Lummis, 2009). Aunque existe cierto grado de similitud entre los residuos del sitio de unión al GABA de esos receptores, el ligando se puede unir en una orientación y conformación diferente. Por ejemplo, en los receptores GABA_A el agonista principal se une en una conformación parcialmente plegada, mientras que en los GABA_ρ y en los receptores homoméricos de invertebrados (RDL), el GABA parece interactuar en una conformación extendida (Woodward et al., 1993; Jones et al., 1998; McGonigle and Lummis, 2010).

También, las interacciones que ocurren en el sitio de unión no siempre están conservadas. En los receptores GABA_A un residuo localizado en el asa A forma una interacción π -catión, mientras que en los receptores GABA _{ρ} el residuo que media estos contactos se encuentra en el asa B, en los RDL dos residuos localizados en el asa B y C contribuyen para formar esas interacciones (Lummis et al., 2005; Padgett et al., 2007; Lummis et al., 2011).

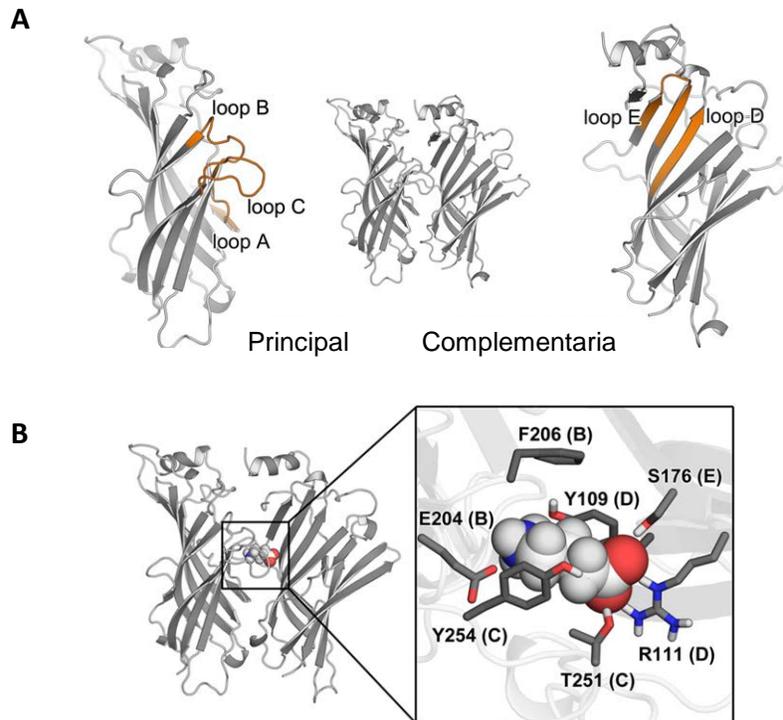


Fig. 14. Ilustración representativa del sitio de unión al ligando en los receptores del asa-*cis*. **A)** Los elementos de la estructura secundaria (asas A–E) involucrados en la unión del agonista de receptores de vertebrados e invertebrados se muestran en color naranja. **B)** El Sitio de unión ocupado por el agonista (izquierda) en los receptores RDL y la posición de las cadenas de aminoácidos interaccionado dentro del sitio de unión también están resaltados (derecha). (Modificada de Ashby et al., 2012).

Como se puede ver, los LGICs homoméricos en vertebrados son muy limitados (con respecto a su estructura tridimensional). Además, los receptores ionotrópicos de invertebrados no se ajustan fácilmente en las categorías de receptores descritas como GABA_A o GABA _{ρ} . La mayoría se distinguen de los receptores de vertebrados

(GABA_A) debido a su insensibilidad a la bicuculina, su baja sensibilidad al ácido 3-aminopropanosulfónico y su alta sensibilidad a la isoguvacina y al muscimol (Buckingham et al., 1994; Hosie and Sattelle, 1996); también difieren de los GABA_ρ porque en invertebrados se ha encontrado modulación alostérica débil (por barbitúricos y benzodiazepinas), además de que presentan alta sensibilidad al muscimol (Rauh et al., 1990).

Ahora, ¿qué se sabe sobre receptores de este tipo en invertebrados? Como se describió previamente, EXP-1 de *C. elegans*, resultó ser un receptor homomérico activado por el GABA con selectividad catiónica, encargado de mediar la contracción muscular entérica en el nematodo (Beg and Jorgensen, 2003). Asimismo, en éste nematodo se han caracterizado varias subunidades *tipo*-RDL (UNC-49A, UNC-49B y UNC-49C) y son codificadas por un único gen que se diferencia por *splicing* alternativo (Bamber et al., 1999). Cuando estas subunidades se expresan en ovocitos de *X. laevis*, UNC-49B por sí sola es capaz de formar canales homoméricos funcionales; y también, se puede ensamblar con la subunidad UNC-49C para formar canales heteroméricos que exhiben una sensibilidad reducida al GABA, así como a varios moduladores e inhibidores del canal (Bamber et al., 2003). Aunque la combinación heteromérica es la única demostrada que funciona de manera nativa en las uniones neuromusculares, y de tener una función particular en el control de la locomoción mediado por el GABA, no se descarta que el homómero también tenga una relevancia funcional intrínseca (Richmond and Jorgensen, 1999).

Igualmente, se aislaron y caracterizaron farmacológicamente dos subunidades (HCO-UNC-49B y HCO-UNC-49C) del nematodo *Haemoncus contortus*. Como sus ortólogos en *C. elegans*, también pueden formar receptores homoméricos y heteroméricos funcionales. Por ejemplo, la subunidad HCO-UNC-49B forma un canal homomérico funcional que responde al GABA y que tiene alta sensibilidad a la PTX; por otra parte, la subunidad HCO-UNC-49C no puede formar canales por sí misma, pero en co-expresión con la isoforma "B" es capaz de dar lugar a canales

heteroméricos funcionales con baja sensibilidad a la PTX, pero con alta sensibilidad a los agonistas en comparación con el receptor homomérico (Siddiqui et al., 2010). Adicionalmente, la expresión del gen *hco-lgc-38* y su posterior análisis electrofisiológico reveló que este codifica para un canal homomérico sensible al GABA y al muscimol, su sensibilidad al agonista principal es similar a los valores reportados para el receptor RDL de *Drosophila*, mientras que su baja sensibilidad al muscimol es similar a los GABARs de nematodos (Siddiqui et al., 2012).

Estos ejemplos de canales homoméricos activados por el GABA fueron estudiados tomando como base la subunidad que forma a los receptores RDL, debido a su potencial uso como modelo para canales iónicos activados por ligando. Esta subunidad originalmente fue identificada en *D. melanogaster* y se encontró que poseía resistencia al insecticida dieldrina, de ahí su nombre (Ffrench-Constant et al., 1991; 1993). La subunidad RDL también es capaz de dar lugar a la formación de receptores homopentaméricos activados por el GABA, el muscimol, el *t*-ACA, la isoguvacina y la β -alanina (Figura 15). Además, se le ha involucrado en el aprendizaje olfatorio y en la vía de estímulos condicionados asociados (Casida, 1993; Liu et al., 2009).

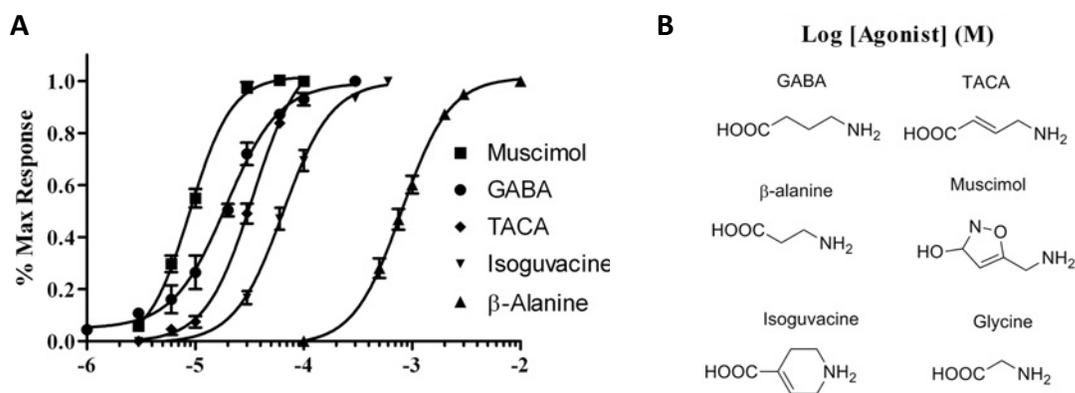


Fig. 15. Curvas concentración–respuesta definidas por los análogos del GABA en los receptores RDL expresados en ovocitos de *Xenopus*. A) Las potencias de los agonistas son muscimol > GABA > *t*-ACA > isoguvacina > β -alanina. La glicina no muestra respuestas en concentraciones >10 mM. B) Estructuras de los análogos del GABA. (Tomada de McGonigle and Lummis, 2009).

Los receptores RDL son los más estudiados en insectos y están relacionados con su contraparte en vertebrados (GABA_ARs) porque su activación abre canales selectivos a cloruro. Sin embargo, también tienen diferencias significativas en su perfil farmacológico debido a que no pueden ser inhibidos por los antagonistas clásicos de los GABA_ARs como la bicuculina, aunque sí son bloqueados por la PTX (Hosie et al., 2001; Buckingham et al., 2005). Con este perfil farmacológico, muchas de las subunidades que se han ido aislando en invertebrados (*Locusta migratoria*, *Plutella xylostella*, *Aedes aegypti*, *Lucilia cuprina*, *Musca domestica*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera litura*, etc.) y que no pueden ser clasificadas dentro del marco de las subunidades clásicas de receptores al GABA, se han denominado “tipo-RDL” (Buckingham et al., 2005; Narusuye et al., 2007; Janssen et al., 2010).

El receptor RDL no sólo es un modelo de los GABA_ARs ionotrópicos en invertebrados, sino que también el ser un canal iónico activado por ligando de tipo homomérico ha resultado bastante útil en enfoques computacionales y de mutaciones sitio-específicas para entender las bases estructurales de la función de canales aniónicos homo- y heteroméricos, así como en el estudio de blancos farmacológicos (pesticidas, insecticidas, antiparasitarios). Asimismo, la subunidad formadora de los receptores RDL es útil como herramienta de modelado molecular para estudiar a los GABA_ARs quiméricos, que permiten la identificación de sitios de unión a moduladores.

5. *Procambarus clarkii*

La introducción de especies exóticas puede amenazar a las especies nativas debido a la depredación, la competencia y por el contagio de nuevas enfermedades (Holdich, 1999; van der Velde et al., 2000). El crecimiento poblacional de una especie recién introducida puede sin duda tener efectos drásticos en las poblaciones residentes. Las interacciones entre las especies nativas y las recién introducidas influyen los procesos horizontales y verticales de la cadena alimenticia dirigiendo a cambios estructurales y funcionales (van der Velde et al., 2000). Entre todos los crustáceos, el acocil de agua dulce *P. clarkii* es un muy buen ejemplo de ello. Es nativo del sur de los Estados Unidos y del noreste de México, y se le ha considerado como una de las especies de acociles más invasivas en el mundo. Se ha introducido en África, Asia y Europa, principalmente debido a su recolección silvestre e introducción en sitios ajenos a su hábitat (Hobbs et al., 1989). Algunos de los múltiples impactos de las poblaciones invasivas de *P. clarkii* son la depredación de anfibios (Gamradt and Kats, 1996) y la modificación en el ambiente de lagos debido al consumo de lechos de macrófitos y por la intensa excavación que provocan. Esto conlleva a una reducción consecuente de la penetración de luz que disminuye la producción de plantas; además, su presencia genera una fuerte competencia con especies nativas, alterando la cadena trófica (Anastácio and Marques, 1997; Matsuzaki et al., 2009).

Esta especie presenta una buena aclimatación a las condiciones de muchos hábitat, siendo considerada la especie de mayor expansión intercontinental, ya que hay registros de su presencia en casi todos los continentes, a excepción de Australia (Hobbs et al., 1989). Asimismo, su ciclo de vida corto y de una alta tasa de reproductividad, ha llevado a esta especie a ser considerada como la de mayor plasticidad ecológica. Esta característica le permite adaptarse a nuevos ambientes, ser tolerante a niveles bajos de oxígeno, a periodos prolongados de sequía y a permanecer en espacios subterráneos. Además de su alta capacidad reproductiva (pone desde 300 hasta 5000 huevecillos), es una de las pocas especies de acocil que puede sobrevivir en agua salada. Si a todo esto se le suma la resistencia al

hongo *Aphanomyces astaci*, sin duda tiene grandes ventajas frente a las especies nativas de cualquier hábitat que presentan una alta susceptibilidad a este (Holdich et al., 1999).

P. clarkii es una especie—r porque tiene una estrategia reproductiva típica de colonizadores que viven en ambientes inestables; en otras palabras, tiene el potencial para multiplicarse rápidamente, produciendo una amplia descendencia casi desde el comienzo de su ciclo de vida. Esto es sin duda una ventaja en ambientes difíciles, permitiendo a los organismos colonizar rápidamente nuevos hábitat y explotar nuevas fuentes de alimento (Gutierrez-Yurrita et al., 1998). La presencia de crías durante el invierno en regiones centrales y del norte de Italia sugiere que las temperaturas bajas no son un factor limitante para su éxito reproductivo ni para la distribución de su especie. También varios experimentos en el laboratorio han mostrado que el acocil tiene la habilidad para sobrevivir y mantener altas tasas de crecimiento a temperaturas más altas de las que especies nativas de diferentes hábitat podrían tolerar (Holdich, 1999).

El acocil *P. clarkii* igualmente es considerado una plaga en los campos de cultivo de arroz porque causa daño físico a los sistemas de irrigación, e interfiere con el crecimiento de las plántulas (Correia, 1993; Anastácio and Marques, 1996; Gutiérrez-Yurrita et al., 1999). Además, varios estudios han documentado que funciona como vector del hongo *A. astaci*, el cual es una plaga en el acocil (Bernardo et al., 1997), y también como es presa de diversas aves, mamíferos y peces, conlleva a la expansión del hongo a más hábitat (Correia, 2001). Sin embargo, la información existente acerca de los efectos de *P. clarkii* en las especies nativas y en los hábitat invadidos sigue siendo limitada, lo cual hace necesario evaluar el impacto de este organismo en las comunidades acuáticas (Larson and Olden, 2008).

De manera interesante, el uso del acocil en el campo científico es alto. Por ejemplo, las neuronas del órgano receptor abdominal han sido usadas para explorar los mecanismo de terapia fotodinámica; esta técnica lleva a la muerte de células

expuestas a la luz, la cual resulta importante en el campo del cáncer (Fedorenko and Uzdensky, 2008). También, hay estudios sobre la respuesta inmune del acocil donde se han podido inducir neoplasias contribuyendo al entendimiento del mecanismo por el cual un organismo previene o controla espontáneamente la proliferación celular inducida (Vogt, 2008). Por otro lado, los mecanorreceptores de *P. clarkii* han sido los primeros sistemas biológicos en los cuales se descubrió el fenómeno de resonancia estocástica (Douglass et al., 1993), un evento que ha sido útil en aplicaciones biofísicas, tecnológicas, así como en contextos biomédicos. Además, varios estudios en este acocil han servido para determinar los niveles de metales pesados (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb and Zn) en ríos mediante el análisis del tejido muscular abdominal evaluando la bioacumulación de metales (Suarez-Serrano et al., 2010).

Asimismo, utilizando este organismo como modelo, se han estudiado diversas hormonas. Por ejemplo, se ha descrito que en el tallo ocular de los crustáceos se localiza el sistema neurosecretor órgano–X/glándula sinusal (Andrew et al., 1978), el cual produce una superfamilia de hormonas llamada Hormona Hiperglicemiente de Crustáceo (CHH) que incluye: la hormona hiperglicemiente (CHH); hormona inhibidora de la muda (MIH); hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH) y hormona inhibidora de la gónada (GIH); además otra familia llamada hormona adipocinética (AKH)/hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH) (Aquiloni et al., 2012; Lok et al., 1977). Cada una de estas hormonas controla diversas funciones fisiológicas, por ejemplo, la CHH participa en la regulación de la glucosa, el metabolismo de lípidos y el de carbohidratos, fenómenos importantes en la respuesta a necesidades energéticas debidas a cambios ambientales o condiciones fisiológicas (Sedlmeier, 1988). La MIH se encarga de suprimir la producción del ecdisteroide, relevante en el proceso de muda (Schoettker and Gits, 1990). Por otro lado, la VIH y la GIH, han sido descritas como elementos significativos en los procesos de maduración de las gónadas (Browdy, 1992; Bray and Lawrence, 1992). Finalmente, la familia AKH está implicada en la movilización de lípidos (Stone et al., 1976); mientras que la familia RPCH se encarga de inducir la retracción del pigmento rojo en eritróforos

tegumentarios, la concentración de los pigmentos accesorios de la retina y de la modulación de la actividad eléctrica de neuronas del sistema estomatogástrico (Fingerman, 1985; Dickinson and Marker, 1989; Dickinson et al., 2001).

Hasta la fecha, muchos de los estudios moleculares que corresponden al género *Procambarus* se han enfocado a la genética poblacional (Li et al., 2012; Liu et al., 2013; Shen et al., 2013; Zhu et al., 2013) e inmunidad (Du et al., 2013; Zhang et al., 2013). En los últimos años, diversos experimentos han incrementado el conocimiento de las neuro-hormonas de crustáceos y de sus estructuras, pero desafortunadamente, la información genómica de esos animales aún no es muy amplia (Hopkins, 2012; Webster et al., 2012). Sin embargo, la caracterización del transcriptoma del tallo ocular de *P. clarkii* ha incrementado significativamente el conocimiento molecular que se tiene de esta especie (Manfrin et al., 2015). Esto representa una nueva herramienta para identificar hormonas que podrían ser usadas como métodos de interrupción de su migración. Asimismo, se abre la posibilidad de investigar receptores ortólogos como los blancos utilizados en insecticidas para limitar su crecimiento. Incluso hay modelos poblacionales de especies invasivas que simulan el movimiento de acociles en un lago virtual hacia bancos de captura, lo cual resulta llamativo para evaluar la invasión en áreas que aún no están infestadas (Martelloni et al., 2012).

JUSTIFICACIÓN

El GABA ha sido definido ampliamente como transmisor inhibitor en las sinapsis periféricas de invertebrados, así como en sinapsis centrales tanto de invertebrados como de vertebrados. Comúnmente se aceptaba que todas las acciones del GABA en el sistema nervioso adulto eran inhibitoras, sin considerar otras posibilidades. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se describió que las corrientes evocadas por el GABA en las neuronas del órgano-X mostraban dos componentes totalmente distintos, uno transitorio que se inactivaba rápidamente y uno sostenido. Lo anterior resultaba interesante porque daba un indicio de que el GABA podría tener una actividad dual en estas células, es decir, que podría fungir como neurotransmisor excitador y como inhibitor.

La corriente sostenida se ha descrito a nivel electrofisiológico en las neuronas del órgano-X, pero sin ningún reporte sobre la naturaleza molecular del receptor responsable. Por otro lado, la corriente transitoria debida al GABA se describió hace ya varios años, pero se interpretó como debida a canales de cloruro, y que su cinética correspondía principalmente a los cambios en el E_{Cl^-} (García et al, 1994). En adición, cuando se analizaban los componentes de las corrientes activadas por el GABA, resultó atractivo el efecto que mediaba un agonista (*c*-ACA) de los receptores GABA ρ , puesto que activaba un sólo componente y que correspondía a la corriente sostenida. Cabe destacar que existen pocos ejemplos donde el GABA puede mediar respuestas despolarizantes que no dependen de los cambios en el E_{Cl^-} , sino de la presencia de proteínas cuyo filtro de selectividad es similar al encontrado en receptores cuyo comportamiento ha sido descrito como excitador, por ejemplo el homómero EXP-1 y el heterómero GRD/LCCH3.

Para explicar la naturaleza de la actividad dual del GABA, se propuso analizar la dependencia iónica tanto de las corrientes transitorias (acción excitadora) como de las corrientes sostenidas (acción inhibitora). Cualquier actividad del GABA que describimos en este análisis no se restringe a ser explicada debido a cambios en el E_{Cl^-} , sino que permite proponer que la acción del GABA como neurotransmisor, al

menos en estas neuronas, no está determinada por su identidad sino por la naturaleza del receptor que activa. Es decir, los fenómenos responsables de tales acciones pueden ser debidos a la presencia de receptores con propiedades especiales en sus poros de permeación, los cuales no han sido aislados molecularmente. Sin duda, esto abre nuevos enfoques experimentales para explicar los fenómenos donde el GABA actúa de manera específica.

Además, los canales iónicos activados por ligando (especialmente aquellos pertenecientes a la familia del *asa-cis*) son los responsables de mediar la neurotransmisión ionotrópica rápida y han sido blancos importantes de fármacos diseñados tanto para vertebrados como invertebrados. El conocimiento de su organización estructural es de gran importancia para entender su funcionamiento real en sistemas biológicos. Con la reciente estructura cristalográfica de un receptor al GABA homomérico (GABA_{AR}- β 3_{cryst}), muchas de las dudas y mecanismos de modulación se han ido esclareciendo. Sin embargo, existen pocos datos disponibles acerca de la estequiometría de los receptores al GABA en invertebrados, y menos aún de la naturaleza de los mismos. Puesto que la composición de las subunidades responsables de formar a los receptores es una determinante para definir sus propiedades biofísicas y farmacológicas, el aumentar la información referente a estas proteínas podría ampliar el panorama del uso que ya tienen actualmente.

Por otro lado, el acocil *P. clarkii* ha sido considerado como una de las especies de crustáceos de agua dulce más importantes económicamente hablando. Es uno de los organismos más agresivos e invasivos en el mundo, y ha colonizado un amplio número de hábitat, con gran impacto sobre la fauna nativa. Su expansión indudablemente ha contribuido a la pérdida de la biodiversidad en las zonas que ha invadido, especialmente en áreas donde las especies nativas no son capaces de competir con el invasor. Pero a pesar de su gran importancia comercial y de ser una de las especies de acocil más estudiadas, pocas de sus proteínas han sido aisladas a nivel molecular. Elucidar las estructuras de estas macromoléculas puede ser de gran utilidad como instrumentos potenciales para el entendimiento del comportamiento del acocil.

Las especies invasivas pueden imponer una fuerte selección en poblaciones nativas y pueden inducir cambios importantes en las comunidades invadidas. No obstante, los estudios acerca de las respuestas que un invasor impone ante el nuevo hábitat invadido son reducidos, pues se requiere replicar el ambiente donde todo se desarrolla. Pese a todo eso, se puede detener la expansión de estos organismos conociendo la naturaleza de las proteínas que son de suma importancia en su desarrollo.

Para ello, en este trabajo se pretende caracterizar el(los) receptor(es) perteneciente(s) a la superfamilia de LGIC expresado(s) en las neuronas del órgano-X, ya que de acuerdo a los primeros estudios electrofisiológicos y farmacológicos hay una gran diferencia con respecto a los encontrados en vertebrados, el(los) cual(es) parece(n) poseer propiedades que se han descrito por separado en receptores GABA_A y GABA_ρ. Puesto que el GABA es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el SNC tanto de vertebrados como de invertebrados, las corrientes de naturaleza despolarizante e hiperpolarizante descritas en las neuronas del acocil pueden regular muchos de los mecanismos biológicos importantes en la supervivencia del mismo.

La información molecular que se obtenga puede proveer la primera evidencia de un(o varios) receptor(es) al GABA en *P. clarkii* que participe(n) como responsable(s) en la regulación de las células neurosecretoras del órgano-X. Estos hallazgos están destinados a ampliar el conocimiento acerca de las proteínas clave en el control de este crustáceo, porque cualquier subunidad de un GABAR aislada puede ser utilizada como importante blanco farmacológico para el desarrollo de pesticidas (antagonistas de los GABA_ARs como dieldrina, lindano, BIDN y fipronil). Asimismo, se amplía el panorama sobre la estructura de estos receptores, conociendo su modulación farmacológica y planteando nuevas propiedades biofísicas que podrían originarse al interactuar con otras subunidades que permanecen sin ser descritas a nivel molecular.

HIPÓTESIS

La naturaleza de las corrientes iónicas activadas por el GABA en neuronas del órgano–X es el resultado de la expresión de al menos dos subunidades formadoras de receptores al GABA (homo– o heteroméricos), cuyas determinantes moleculares definen la selectividad iónica.

OBJETIVOS

- GENERAL

Identificar molecular y electrofisiológicamente la(s) subunidad(es) que subyacen a la selectividad iónica de los receptores al GABA en neuronas del órgano–X del acocil *P. clarkii*.

- ESPECIFICOS

1. Aislar electrofisiológicamente mediante estudios de sustitución iónica las corrientes activadas por el GABA en neuronas del órgano–X.
2. Identificar molecularmente con la técnica de RACE, la(s) subunidad(es) que forman receptores al GABA, y que definen la naturaleza iónica de las corrientes observadas en las células neurosecretoras.
3. Expresar en células HEK 293T el(los) ADNc aislado(s) de la(s) subunidad(es) correspondiente(s) a receptores para el GABA.
4. Caracterizar electrofisiológica y farmacológicamente las corrientes generadas por la(s) subunidad(es) de el(los) receptor(es) al GABA expresadas de manera heteróloga.
5. Evaluar la distribución del ARNm que puede codificar para la(s) subunidad(es) del(los) receptor(es) al GABA en las neuronas del órgano–X mediante hibridación *in situ*.

MÉTODOS

1. Animales, mantenimiento y disección

Todos los experimentos se realizaron utilizando acociles adultos de la especie *P. clarkii*. Los especímenes, provenientes del Río Conchos (Chihuahua, México), fueron mantenidos en el bioterio en agua recirculante a ~ 20 °C, con ciclos luz/oscuridad de 12 h/12 h y alimentados *ad libitum* con zanahorias. Para la disección, los animales fueron previamente anestesiados colocándolos en un recipiente con hielo durante un lapso de 35 min. El tallo ocular se extrajo cortando cuidadosamente con tijeras de disección y se colocó en solución salina la cual contenía (en mM): 205 NaCl, 5.4 KCl, 13.5 CaCl₂, 2.6 MgCl₂ y 10 HEPES, ajustada a un pH de 7.4 con NaOH. El exoesqueleto y el tejido conectivo que rodean al órgano-X fueron removidos bajo el microscopio. Una vez limpio se colocó en un homogeneizador para la extracción del ARN total, o se usó para el cultivo celular descrito posteriormente.

2. Extracción de ARN total

El ARN total fue extraído utilizando la metodología basada en Trizol, lavando previamente todo el material usado con NaOH 1N. Una vez disecados los órganos-X se depositaron en un homogeneizador, al cual se le agregaron 100 µl de Trizol. El tejido homogeneizado durante 30 s fue transferido a un tubo tipo *Eppendorf* de 1.5 ml, se añadieron dos volúmenes de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s. Posteriormente, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 2–5 min, y transcurrido este tiempo se centrifugó a 18,928 g durante 10 min. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo (evitando tocar la interfase) y se le adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol. Inmediatamente se mezcló el contenido invirtiendo el tubo varias veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, para finalmente centrifugar la mezcla a 18,928 g durante 5 min. El sobrenadante se removió con cuidado, la pastilla se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 18928 g durante 10 min. Finalmente, el etanol se eliminó por completo, la pastilla se resuspendió con agua libre de nucleasas y se almacenó a – 20 °C hasta su uso. El ARN total extraído

de cada tejido (tallo ocular, ganglio cerebroide, ganglio abdominal, ganglio torácico, hepatopáncreas y músculo) se cuantificó en un Epoch™.

3. Síntesis del ADNc

El ADNc se sintetizó a partir de los ARN totales obtenidos utilizando la transcriptasa reversa (M–MULV: Moloney Murine Leukemia Virus), dNTPs y el oligonucleótido linker–dT (cctaggtcgaccggtgatgaattctttttttttttttttt). La retrotranscripción se realizó en dos fases: en la primera, el ARN total (126 ng) en conjunto con 1 µl de linker–dT (100 µM) se incubaron a 65 °C durante 5 min y la mezcla se enfrió rápidamente en hielo; en la segunda fase se añadieron 4 µL del regulador de reacción (5x), 0.5 µl del inhibidor de ARNasas (40 U/µl), 1 µl de dNTPs (10 mM cada uno) y 1 µl de M–MULV (20 U/µl), todo a un volumen final de 20 µl. Posteriormente, la mezcla total se incubó a 37 °C/60 min con un ciclo final de 10 min a 70 °C para inactivar a la enzima. Una vez terminada la reacción, 30 µl de H₂O libre de nucleasas se agregaron al ADNc y se almacenó a – 20 °C hasta su uso.

4. Diseño de oligonucleótidos y clonación del ADNc parcial de la subunidad de un receptor al GABA

Para la amplificación parcial del ADNc de subunidades para GABARs de *P. clarkii* se diseñaron oligonucleótidos degenerados mediante el alineamiento múltiple de diversas secuencias pertenecientes a subunidades de los GABARs en invertebrados. Con el alineamiento múltiple se generaron bloques de secuencias consenso utilizando el algoritmo CODEHOP “*CO*nsensus–*DE*generate *Hybrid Oligonucleotide Primers*” (Rose et al., 2003), lo cual permitió el diseño de oligonucleótidos degenerados. Con los oligonucleótidos diseñados (Tabla 1) y utilizando como molde el ADNc sintetizado, se amplificó por reacciones de PCR anidada el ADNc de posibles subunidades de receptores al GABA. Los amplicones fueron resueltos en geles de agarosa al 1%, purificados por columna, ligados en el vector pJET1.2 (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas, St. Leon–Rot, Germany) y transformados en bacterias competentes DH5α, para finalmente secuenciar las

clonas positivas. Con la secuencia parcial obtenida de una subunidad de un GABAR de acocil se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 1) utilizando el programa Clone Manager 9 (Scientific and Educational ©1994–2010, Cary, NC, USA). Simultáneamente se diseñaron oligonucleótidos específicos para la secuencia de la gliceraldehído 3–fosfato deshidrogenasa (AB094145.1) de *P. clarkii*, la cual se usó como control positivo de las amplificaciones subsecuentes.

5. Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE 3' y 5') de pcGABA_Aβ

RACE 3'

La síntesis de la primera hebra de ADNc se obtuvo de la población de los ARNm haciendo uso de la secuencia natural que estos poseen (cola de poli–A). Para esto, se utilizó un oligonucleótido adaptador (linker–dT) el cual contiene en su extremo 3' una cola homopolimérica (poli–T) y una secuencia definida con sitios de restricción para algunas enzimas (La retrotranscripción se realizó como está descrita en el apartado “Síntesis del ADNc”). Una vez sintetizado el ADNc, la primera ronda de PCR se llevó a cabo mezclando lo siguiente (volumen final de 25 µl): 5 µl de buffer de reacción (5x), 1 µl de dNTPs (5 mM), 0.1 µl de la polimerasa Q5 DNA pol (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, 5 U/µl), 5 µl del potenciador de reacción (enhancer 5x), 1 µl del primer específico en sentido pcGABARf1 (TCCTGGGTGTCGTTCTGG, 10 µM), 1 µl del primer adaptador linker (cctaggtcgaccggtgatgaattc, 10 µM) y 1 µl del ADNc recién sintetizado. Los ciclos utilizados en el termociclador fueron: 1x 2.5 min a 95 °C, 30x (30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C), 1x 5 min a 72 °C. Terminada la reacción de PCR, la muestra se mantuvo a 4 °C hasta su uso. La segunda reacción (PCR anidada) se realizó de manera similar a la primera, pero esta vez se utilizó otro oligonucleótido específico pcGABARf4 (ACCACTGTGCTTACCATGAC, 10 µM), el cual está localizado más 3' en la secuencia.

RACE 5'

La primera hebra de ADNc se sintetizó a partir del ARN total. Para ello se utilizó el oligonucleótido específico pcGABARr1 (GCAGCGTTGGTTGAAGACAT, 10 μ M) y la transcriptasa reversa M-MULV (1 μ l, 20 U/ μ l) (el protocolo es similar al descrito en el apartado "Síntesis del ADNc"). El ADNc obtenido fue purificado en columna (Kit Gel and PCR clean up system, Promega, Madison, WI, USA) para remover el ARN total inicial, los dNTPs no incorporados y los oligonucleótidos restantes. Posteriormente, para obtener un sitio de unión al oligonucleótido adaptador (linker-dT) se requirió de la adición de una cola homopolimérica en el extremo 3' del ADNc recién sintetizado. Para ello se preparó la siguiente mezcla (en un volumen final de 35 μ l): 3.5 μ l del regulador de reacción (10 \times), 3.5 μ l de CoCl₂ (2.5 mM), 1.5 μ l de dATP (5 mM), 0.5 μ l de la desoxinucleotidil-transferasa terminal (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, 10 U/ μ l) y 1 μ l del ADNc recién sintetizado. Finalmente, la mezcla de reacción se incubó a 37 °C/ 30 min y se inactivó la enzima a 70 °C/ 10 min. La primera ronda de amplificación por PCR se realizó aplicando las mismas condiciones de PCR descritas en la sección "RACE 3'", sólo que para esta reacción se utilizó 1 μ l del oligonucleótido adaptador linker-dT (10 μ M) en conjunto con 1 μ l del oligonucleótido específico inicial pcGABARr1 (10 μ M) y como molde el ADNc modificado con la cola homopolimérica (poli-A) recién añadida (Sambrook and Russell, 2001). Las posteriores reacciones de PCR anidada se realizaron con la combinación de 1 μ l del oligonucleótido adaptador linker (10 μ M) y 1 μ l del oligonucleótido específico pcGABARr3 (TGGCAGGAGTTGCTGATCG, 10 μ M). A la par se prepararon reacciones incluyendo otros oligonucleótidos específicos como pcGABARr2 y pcGABARr4 (Ver Tabla 1), los cuales están localizados hacia la región 5' (Figura 20).

Los productos amplificados por RACE se analizaron utilizando enzimas de restricción y se resolvieron en geles de agarosa. Una vez cortadas las bandas del gel se purificaron en columna y se ligaron en el vector pJET1.2 para su posterior secuenciación. Los amplicones resultantes fueron usados para generar un ADNc completo haciendo uso de la técnica de extensión del empalme por PCR (Higuchi

et al., 1988). El ADNc final que codifica para una subunidad de un GABA_AR se clonó en el vector bicistrónico pIRES2–EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) utilizando los sitios para las enzimas NheI y SacII.

Para la amplificación de una región de pcGABA_Aβ en los diferentes tejidos, se partió de 126 ng de ARN total. Los productos amplificados a partir del ADNc se llevaron a cabo utilizando los oligonucleótidos pcGABARf16 y pcGABARR14, dando un amplicón con un tamaño de 469 pb.

6. Análisis de la secuencia de aminoácidos de pcGABA_Aβ

El análisis comparativo de la secuencia obtenida a partir del órgano–X del acocil contra otras secuencias alojadas en las bases de datos, así como también el análisis para la búsqueda de dominios conservados, fueron llevados a cabo utilizando los algoritmos del programa BLAST, disponibles en el portal del National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para el alineamiento múltiple de secuencias se usó ClustalW2, una herramienta en línea enfocada en el análisis molecular de secuencias, la cual que se encuentra en el portal <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>. La masa molecular y el punto isoeléctrico de la subunidad aislada fueron calculados utilizando una herramienta para calcular propiedades de proteínas que se localiza en el sitio en línea <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>. Otras cualidades como los sitios de modificaciones post–traduccionales y la región del péptido señal fueron predichas usando servidores de predicción CBS del Centro para análisis de secuencias biológicas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). La secuencia correspondiente al péptido señal y los sitios para N–glicosilación, O–glicosilación y fosforilación fueron analizados mediante los servidores SignalP3.0, NetNGlyc1.0, DictyOglyc1.1 y NetPhos2.0, respectivamente. La predicción de la estructura secundaria de pcGABA_Aβ fue realizada haciendo uso del software en línea CFSSP *Chou* y el servidor de predicción de estructura secundaria *Fasman*, los cuales están disponibles en <http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>. La predicción de los dominios transmembranales presentes en la secuencia de la subunidad aislada fue

lograda con el software TMHMM v2.0 (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>). En el caso de la estructura terciaria de pcGABA_Aβ, esta fue construida utilizando el modelo terciario homólogo del homopentámero GABA_AR-β3_{cryst} (Miller and Aricescu, 2014) y haciendo uso de la herramienta de análisis estructural RaptorX alojada en la dirección <http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction>. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 6 (www.megasoftware.net) mediante el algoritmo “Maximum Likelihood” (Jones et al., 1992), y para modificar la versión final de la imagen se hizo uso del programa Adobe[®] Illustrator[®] CC.

7. Hibridación *in situ*

Síntesis de la sonda para la HIS

Para llevar a cabo la HIS, las sondas de ARNc diseñadas para hibridar a pcGABA_Aβ se prepararon a partir del ADNc completo correspondiente a pcGABA_Aβ y ligadas en los sitios Apal y Nsil del vector PGEM-T (Promega, Madison, WI, USA). La sonda fue diseñada para hibridar parte de la región 3' que corresponde a la secuencia “tgcgcatgcatctagAAGCTGTACGGTTGCTCACcctctgacatcgataagtattctaggatcgtgtcc ccgtgtgtttgtgtgtttcaacctcatgtactggatcatctacctgcacatctccgacgactccacgggggacCTCA TCATTCAACAACGCTGATGGTTGACTCGAGggccctagg”, la cual incluyó sitios de restricción para las enzimas Nsil/Xbal en el extremo 5' y XhoI/Apal en el extremo 3'. Previo a la transcripción *in vitro*, el plásmido PGEM-T que contenía el ADNc correspondiente a la sonda se linearizó ya sea con la enzima de restricción Xbal o XhoI para la síntesis de las sondas de ARN en sentido y en antisentido, respectivamente. La reacción de transcripción se preparó en frío como sigue (a un volumen final de 22 μl): 4 μl de ADNc linearizado (600 ng/μl), 2 μl de la mezcla de nucleótidos marcados (10x), 2 μl del regulador de reacción (10x), 1 μl del inhibidor de ARNasas y 2 μl de la polimerasa SP6 RNA pol (20 U/μl, para la sonda en antisentido) o 2 μl de la polimerasa T7 RNA pol (20 U/μl, para la sonda en sentido). Inmediatamente, la reacción se mezcló e incubó a 37 °C/2 h, seguido de una incubación con 2 μl de ADNasa I durante 15 min/37 °C. Finalmente, la reacción se

detuvo agregando 2 µl de 0.2 M EDTA (pH 8.0). El nucleótido UTP acoplado con la digoxigenina (Dig) fue usado como indicador (Roche, Mannheim, Germany). La sonda marcada con Dig se detectó por medio de un anticuerpo anti-Dig (Roche, Mannheim, Germany) acoplado a la rodamina.

Preparación de los tejidos para la HIS

Los tallos oculares del acocil se aislaron y se fijaron inmediatamente en paraformaldehído (PFA)–PBS al 4% en cajas multipozo durante 3 h. Después de la fijación, los tejidos se trataron como se describe a continuación: se lavaron 2x 10 min en PBS, 15 min en PBS/Tritón X–100 al 0.3% y 3 min en PBS (25 °C). Inmediatamente, se procedió a incubarlos con proteinasa K (NEB, Ipswich, MA, USA) durante 10 min a 37 °C (0.1 M Tris–HCl, 0.05 M EDTA pH 8, 1 µg/ml proteinasa K), seguido de una fijación de 5 min en PFA y con un lavado de 2x 3 min en PBS (25 °C). Finalmente, los tejidos se sometieron a acetilación durante un lapso de 10 min con una mezcla de 4x SSC, 0.1 M de trietanolamina y anhídrido acético al 0.25% (25 °C). Una vez realizado lo anterior, los tallos oculares fueron colocados en solución de prehibridación que contiene formamida al 50% y 2x SSC durante 30 min a 37 °C.

Para proceder con la hibridación, las sondas se desnaturalizaron a 65 °C por 10 min. Esta etapa se realizó a 45 °C durante un periodo de 6 h con 50 µl de mezcla de hibridación (20x SSC, formamida al 50%, dextran sulfato al 20%, 10x PBS, 10% de sarcocil, 100x de solución Denhardt, 10 mg/ml ADN de esperma de salmón, 10 mg/ml de ARNt de levadura, 0.1 M de DTT y 10 mg/ml de poli–A) y las ribosondas marcadas con Dig, diluidas a una concentración final de 20 ng/100 µl. Después de la hibridación, los tejidos se lavaron durante 10 min en 1x SSC (45 °C), 15 min en 2x SSC más 50% de formamida (45 °C), 20 min en 2x SSC más 50% de formamida (45 °C), 2x 3 min en 2x SSC (25 °C); en seguida las muestras se trataron con ARNasa A (50 µg/ml; Qiagen, Hilden, Germany) en 2x SSC con 1 mM de EDTA (pH 8) durante 30 min a 37 °C; finalmente, los tejidos se lavaron 2x 3 min en 2x SSC y 15 min en 2x SSC más 50% de formamida (45 °C). A continuación, las muestras

se enjuagaron con reactivo de bloqueo al 5% (PerkinElmer, Boston, MA, USA) en 1x PBS por 1 h a 25 °C, después se colocaron 1 h (25 °C) en una mezcla que contenía reactivo de bloqueo al 3%, Tritón X-100 al 0.3%, 3% de BSA y solución A (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl); a continuación se enjuagaron con solución A durante 5 min (2x) a 25 °C. Inmediatamente, los tejidos se incubaron con el anticuerpo anti-Dig acoplado a rodamina (1:200) en solución que contenía 0.3% de Tritón X-100 y 2% de BSA, esto durante 1 h a 25 °C. El exceso de anticuerpo se eliminó con un lavado de 5 min en solución A y 2x 5 min en PBS. Para la contratinción de los núcleos celulares se utilizó DAPI (10 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Con la hibridación finalizada, los tejidos se montaron en portaobjetos y la señal del ARNm se detectó con un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 700 equipado con óptica Zeiss.

8. Cultivo celular y transfección en células HEK

Los órganos-X aislados fueron incubados durante 60 min con 200 µg/ml de colagenasa-dispasa (Roche, Mannheim, Germany) disuelta en medio de cultivo Leibovitz L-15 modificado (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA). El tejido se lavó para eliminar la enzima utilizando medio de cultivo L-15; las células del órgano-X fueron disociadas mediante succión suave utilizando micropipetas de vidrio, tal como se describió para las células *Retzius* de sanguijuela (García et al., 1989), y se colocaron en cámaras de registros previamente tratadas con concanavalina A tipo III (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La composición iónica del medio de cultivo L-15 se ajustó con la descrita en la solución salina de acocil mediante la adición de 5.5 mM de glucosa, 2 mM de L-glutamina, 5 mg/ml de estreptomycin, 5 U/ml de penicilina (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 16 µg/ml de gentamicina (Schering-Plough, México DF, México).

Para el caso de las células HEK 293T (ATCC® CRL-11268™), éstas fueron mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml

de penicilina y 50 mg/ml de estreptomina. Las células se incubaron a 37°C en una atmosfera del 95% de aire y CO₂ al 5%. Aproximadamente 1–3 × 10⁶ células fueron colocadas en cajas Petri de cultivo (35 mm) un día antes de la transfección, la cual se realizó con 2 µg del ADNc pcGABA_Aβ (subunidad clonada en el vector bicistrónico pIRES2–EGFP) utilizando el método de polietilenimina (PEI, 25 kDa) (Reed et al., 2006). Posteriormente, 24–72 h después de la transfección, aproximadamente 10³ células fueron sembradas en cámaras de registro precubiertas con poli-L-lisina e incubadas al menos 1 h antes de su uso. Las células transfectadas fueron identificadas por epifluorescencia utilizando la GFP como marcador al momento del registro.

9. Electrofisiología

Todos los registros de las neuronas del órgano-X fueron realizados con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa (Sackmann and Neher, 1983) mientras las células eran perfundidas con solución salina de acocil. Los electrodos de borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) fueron usados a una resistencia final de 2–3 MΩ y se llenaron con solución interna (en mM): 207 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 EGTA–Na y 10 HEPES, ajustada a pH 7.4 con KOH. Las corrientes fueron registradas con un amplificador Axopatch 200A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), filtradas a 10 kHz y digitalizadas (5 kHz) a la computadora utilizando una interfaz Digidata 1440A en conjunto con pClamp 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Las corrientes fueron evocadas con 10 µM de muscimol y del c-ACA a potenciales de mantenimiento entre – 60 y – 30 mV. Para el caso de los experimentos de sustitución iónica, la composición de las soluciones fue dependiente del ion bajo estudio. Cuando se analizaron las corrientes dependientes de Na⁺, el catión NMDG⁺ (cloruro de *N*-metil-*D*-glucamina, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) fue utilizado en lugar del sodio. En los estudios de permeabilidad del cloruro, los iones Cl[–] fueron reemplazados con el anión metanosulfonato (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). La composición de la solución para la evaluación de la permeabilidad al sodio fue (en mM):

205 NMDG–Cl, 5.4 KCl, 2.6 MgCl₂, 13.5 CaCl₂ y 10 HEPES, ajustada a pH 7.4 con NaOH; la solución interna no fue modificada. Para las corrientes dependientes de Cl⁻ se utilizó un puente de agar y con la solución externa compuesta de (en mM): 205 NaOH, 5.4 KOH, 2.6 Ca(OH)₂, 13.5 MgSO₄ y 10 HEPES, pH 7.4 ajustado con KCH₃SO₄. Para la solución interna los componentes fueron (en mM): 207 KCH₃SO₄, 14 KOH, 2 Ca(OH)₂, 1 MgSO₄, 5 EGTA–Na y 10 HEPES, a pH 7.4 ajustado con KCH₃SO₄.

Las células HEK transfectadas fueron registradas en fijación de voltaje utilizando la configuración en célula completa. Todas las corrientes fueron obtenidas en solución salina normal que consistió en (mM): solución externa, 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂ y 10 HEPES, pH 7.4 ajustado con NaOH; y solución interna, 140 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, ajustada a pH 7.4 con NaOH. Las pipetas de registro con resistencias de 5–10 MΩ se llenaron de solución interna. Los agonistas y antagonistas para los GABA_ARs se disolvieron en solución externa y fueron aplicados a la célula en estudio mediante flujo por gravedad. La cámara de registro fue continuamente perfundida con solución externa (aproximadamente 1 ml/min). Los compuestos como el GABA, el muscimol y el c–ACA fueron aplicados a la célula en las concentraciones siguientes: 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μM. La bicuculina y la picrotoxina fueron usadas a 100 μM y 1 mM, respectivamente. Todos los reactivos utilizados se adquirieron de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

10. Análisis de datos

La adquisición y el análisis de los datos se realizó usando el software pClamp 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), los datos resultantes fueron ajustados con el programa SigmaPlot 12 (Systat Software, San José, CA, USA). Las curvas concentración–respuesta de las células registradas fueron normalizadas con los valores máximos promediados de al menos 6 células. Para el ajuste de las curvas con los datos promedio normalizados se utilizó una ecuación de Hill de cuatro parámetros.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El GABA evoca corrientes dependientes de aniones y cationes en las neuronas del órgano-X

En trabajos previos realizados en las células neurosecretoras del órgano-X del tallo ocular de acocil, se mostró que el GABA puede inducir corrientes robustas en función de su concentración y de los potenciales de mantenimiento utilizados (García et al., 1994). En principio utilizamos la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa para examinar los efectos del GABA en las neuronas del órgano-X del acocil. Para lo anterior, perfundimos las células con solución salina normal y mantuvimos su potencial de membrana entre -60 mV y -30 mV. Como se ilustra en la Figura 18A, el agonista principal GABA evocó una corriente entrante transitoria seguida de una corriente sostenida con un potencial de inversión de -45 mV, la cual disminuyó lentamente una vez que el pulso del agonista finalizó. El efecto anterior fue mimetizado por las mismas concentraciones del agonista muscimol, mientras que el agonista α -ACA evocó principalmente la corriente sostenida (Figura 18B-C). Esto sugiere que posiblemente dos clases de receptores están mediando las respuestas al GABA en las neuronas bajo estudio. De hecho, con la relación corriente-voltaje obtenida para las corrientes sostenidas evocadas por los agonistas (promediadas en cada valor de potencial de membrana), la línea cruzó el eje del voltaje en el valor esperado para el potencial de equilibrio del cloruro, E_{Cl^-} (Figura 18D, símbolos color negro ■); estos datos son consistentes con la hipótesis de que el receptor podría conducir iones cloruro. Por otra parte, el potencial de inversión para las corrientes transitorias evocadas por el GABA o el muscimol fue cercano a -21 mV (Figura 18D, símbolos rojos ●), lo cual apunta a que otros iones podrían estar permeando a través del canal y, consecuentemente, esas corrientes pueden ser mediadas por canales catiónicos no selectivos activados por el GABA (Thorn and Petersen, 1992).

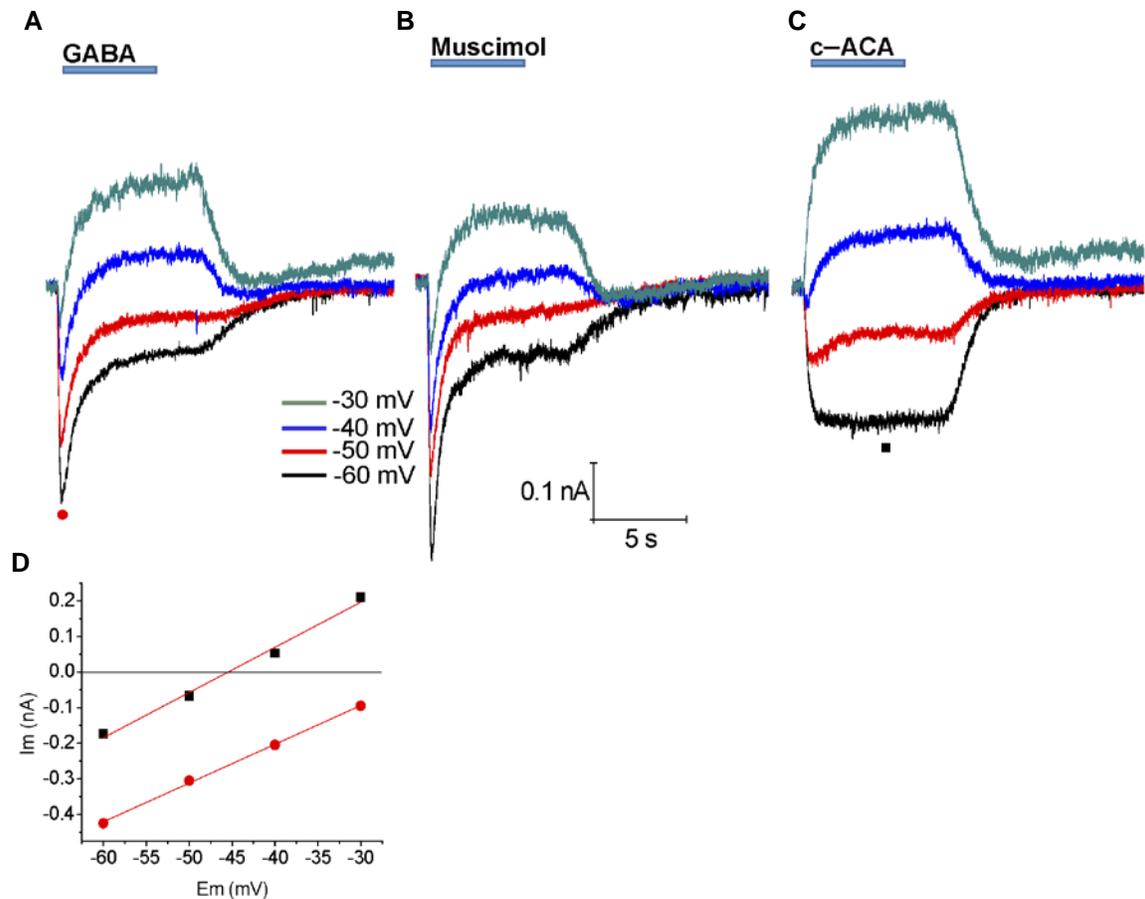


Fig. 18. Naturaleza iónica de las corrientes activadas por el GABA en las neuronas del órgano-X. A-C) Trazos de corrientes representativas inducidas por la aplicación de agonistas de los GABARs ionotrópicos indicados. La aplicación fue de 5 s a una concentración de 10 μ M en la misma célula. El curso temporal de las corrientes evocadas por el GABA y el muscimol consistió de una corriente entrante transitoria seguida de una corriente sostenida que invertía entre - 50 y - 40 mV. El agonista c-ACA activó principalmente la corriente sostenida con un potencial de inversión similar a la corriente activada por el GABA y el muscimol. **D)** Curva corriente-voltaje de las corrientes transitorias y sostenidas; las amplitudes máximas promediadas de las corrientes sostenidas activadas por los 3 agonistas están graficadas en función del V_m . La corriente transitoria (●) invirtió cerca de - 21 mV; en contraste, el V_{rev} para la corriente sostenida (■) fue alrededor de - 45 mV ($[Cl^-]_o / [Cl^-]_i = 240 \text{ mM}/40 \text{ mM}$).

Para obtener evidencia adicional de la naturaleza iónica de la respuesta transitoria producida por el GABA evaluamos el efecto de los agonistas bajo estudio variando las condiciones iónicas extracelulares. Cuando se reemplazó el sodio de la solución salina normal con un cation de mayor tamaño como la NMDG⁺ observamos que la corriente transitoria evocada por el GABA o el muscimol (Figura 19A–B) se abolía. Sin embargo, la corriente activada por el α -ACA no mostraba alteración alguna en amplitud o en su curso temporal (Figura 19C). Estos datos sugieren que los GABA_ARs responsables de mediar las corrientes observadas no son permeables a cationes de mayor tamaño como la NMDG⁺, pero sí para cationes más pequeños como el Na⁺. Por otro lado, tanto las corrientes transitorias como las sostenidas fueron bloqueadas por el antagonista picrotoxina (Figura 19D), efecto que no se observó cuando se utilizó el bloqueador bicuculina (Figura 19E).

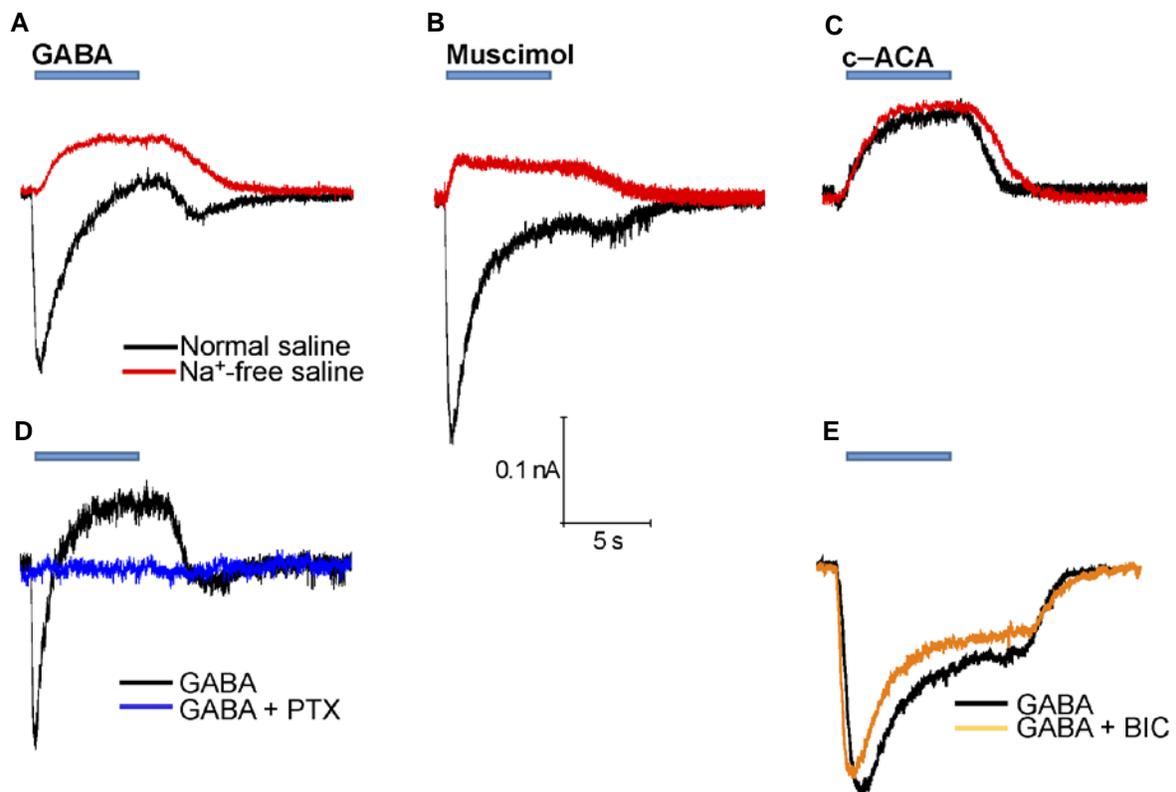


Fig. 19. Estudios de sustitución iónica. A–C) Corrientes representativas obtenidas aplicando los agonistas (10 μ M) de los GABARs durante 5 s, a un potencial de mantenimiento de -40 mV. Se muestran las corrientes registradas en solución con Na^+ extracelular normal (en color negro) y después de la perfusión con solución libre de sodio (en color rojo). Las corrientes transitorias activadas por el GABA y el muscimol son abolidas, mientras que las corrientes sostenidas evocadas por el c-ACA no se modificaron ni en amplitud ni en su curso temporal. **D)** Efecto de la picrotoxina (100 μ M) en las corrientes evocadas por el GABA. La PTX abolió las corrientes transitorias y sostenidas (en color azul). **E)** Efecto de la bicuculina (100 μ M) en las corrientes activadas por el GABA (color negro). Este antagonista no produjo cambio alguno en las corrientes evocadas por el agonista usado (color naranja). La escala es la misma para todos los trazos de corriente.

Con los resultados anteriores se puede inferir que la contribución iónica para cada corriente es diferente; en tanto que la corriente rápida puede ser debida a un influjo de cationes, la corriente lenta parece apuntar a que el ion responsable es el cloruro. Con esto, las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de la respuesta dada

por el GABA en las neuronas del órgano–X sugieren que al menos dos clases de los GABARs están mediando los efectos descritos previamente.

Debido a que la similitud al nivel de secuencia entre las subunidades aniónicas de los GABARs con las pocas subunidades catiónicas descritas hasta la fecha es extremadamente baja (y considerando que han sido descritas en organismos diferentes), ha resultado difícil poder aislar cada subunidad responsable de mediar las respuestas al GABA en las neuronas del órgano–X. Por tanto, nos enfocamos específicamente en la clonación molecular y la expresión funcional de la subunidad de los GABARs que están mediando la respuesta al GABA de tipo aniónica.

Clonación molecular de un receptor al GABA ionotrópico

Cuando empezamos con la búsqueda de la subunidad que pudiera explicar las corrientes sostenidas observadas en las neuronas del órgano–X, tuvimos que recurrir a la exploración de secuencias pertenecientes a subunidades de receptores al GABA en invertebrados depositadas en las bases de datos. Las subunidades para los GABARs de invertebrados de las que encontramos secuencias fueron las siguientes: *Homarus americanus* AAM47020; *Drosophila melanogaster* AAA19249; *Drosophila simulans* AAK00512; *Apis mellifera* ABG75734; *Plutella xylostella* ACN52598; *Chilo suppressalis* ADK74004; *Heliothis virescens* CAB41615; *Spodoptera exigua* ABQ45398; *Culex quinquefasciatus* XP_001850097; *Lucilia cuprina* AAB81966; *Musca domestica* BAD16658; *Bombyx mori* ADM88006; *Tribolium castaneum* NP_001107764; *Laodelphax striatellus* BAF31884; *Aedes aegypti* AAA68961; y *Ceratitis capitata* AAD51101. Una vez elegidas las secuencias, éstas fueron alineadas para generar bloques de secuencias consenso por medio del algoritmo CODEHOP y así diseñar oligonucleótidos degenerados para la búsqueda inicial de una secuencia en el acocil (Figura 20).

gi 21358767 gb AAM47	(267)	GYyliQIYIPSSLIvVIsWVSFWLNRsATP	ARVSLGVTTVLTMTTLMSSTNAALP	100
gi 405123 gb AAA1924	(267)	GYyliQIYIPsGLIvVIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		79
gi 12699096 gb AAK00	(267)	GYyliQIYIPsGLIvVIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		79
gi 11055508 gb ABG7	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		78
gi 224496443 gb ACN5	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		78
gi 301344568 gb ADK7	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		80
gi 24661416 ref NP_5	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		78
gi 4691327 emb CAB41	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		80
gi 146771445 gb ABQ4	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		80
gi 170044966 ref XP_	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		80
gi 2565319 gb AAB819	(267)	GYyliQIYIPsGLIvVIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		79
gi 49205114 dbj BAD1	(267)	GYyliQIYIPsGLIvVIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		79
gi 306448447 gb ADM8	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		78
gi 167466290 ref NP_	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		78
gi 114650274 dbj BAF	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		78
gi 881590 gb AAA6896	(267)	GYyliQIYIPsGLIvIIsWVSFWLNRDATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		86
gi 5762320 gb AAD511	(267)	GYyliQIYIPsGLIvVIsWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSTNAALP		79

Fig. 20. Bloque de secuencias consenso para el diseño de oligonucleótidos degenerados. En color rojo se resalta la región de la secuencia que conforma el dominio M2, región determinante en la selectividad iónica. Se requirió del alineamiento de secuencias de subunidades de receptores activados por el GABA de *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Musca domestica*, *Aedes aegypti*, entre otros.

Los oligonucleótidos diseñados y sintetizados (Tabla 1) fueron alineados con la única secuencia obtenida de un receptor al GABA en crustáceos (Hollins and McClintock, 2000) para identificar la posición relativa en los amplificadores obtenidos de *P. clarkii*. Todos los oligonucleótidos flanquean posiciones relativas hacia 5' y 3' de la región del dominio TM2 de la secuencia en *H. americanus* buscando amplificar regiones correspondientes en el acocil.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos.

Oligonucleótidos	Secuencias 5'–3'
Degenerados	pcGABADf3 ATGGGCTACTACCTGATCCAGATHHTAYATHCC pcGABADf4 GATCATCTCCTGGGTGTCCTTYTGGYTNA pcGABADr3 CAGGGAGGCGAACACCATNACRAARC pcGABADr4 GCGTACTCCAGCAGGGAGGYRAANACCAT
Específicos para RACE 3'	pcGABARf1 TCCTGGGTGTCGTTCTGG pcGABARf2 GTCGTTCTGGCTCAACCGATCA pcGABARf3 GGCTCAACCGATCAGCAACT pcGABARf4 ACCACTGTGCTTACCATGAC pcGABARf5 CTTACCATGACCACGCTCATG pcGABARf6 CCACGCTCATGTCTTCAACC pcGABARf7 GCCCTGCCCAAGATATCATATG
Específicos para RACE 5'	pcGABARr1 GCAGCGTTGGTTGAAGACAT pcGABARr2 ACATGAGCGTGGTCATGGT pcGABARr3 TGGCAGGAGTTGCTGATCG pcGABARr4 TGATCGGTTGAGCCAGAA
Adaptador universal	Linker–dT CCTAGGTCGACCGGTGATGAATTC(T) ₁₈
Adaptador de anclaje universal	Linker CCTAGGTCGACCGGTGATGAATTC

Tras la síntesis de ADNc a partir de ARN total y utilizando varias combinaciones de los oligonucleótidos degenerados enlistados previamente, se logró amplificar por la PCR un fragmento de 225 pb que se acerca al tamaño esperado de acuerdo con la posición relativa de los oligonucleótidos en la secuencia del *H. americanus* (Figura 21).

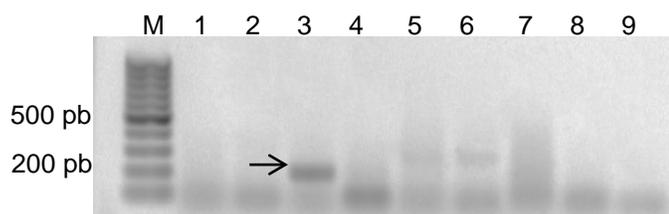


Fig. 21. Amplificación de fragmentos de una subunidad correspondiente a un receptor al GABA en *P. clarkii*. Gel de agarosa al 1.2 %, se observan los amplificados del órgano–X de *P. clarkii* (carriles 1–4); como control de amplificación se usó ADNc de rata (carriles 5–8). Con una flecha se señala la banda amplificada de ~225 pb. M, marcadores de peso molecular para ADN de 100 pb.

La banda amplificada fue cortada y purificada en columna para ligarla en el vector pJET1.2 y consecutivamente se solicitó su secuenciación. Con esto, aislamos una secuencia parcial de lo que parecía corresponder a una subunidad de un receptor al GABA. Basados en la secuencia obtenida se diseñaron nuevos oligonucleótidos para las amplificaciones posteriores mediante la técnica de RACE. Asimismo, esta secuencia parcial nos permitió ubicar la región del dominio TM2, los aminoácidos determinantes para la selectividad iónica y sitios de restricción para enzimas (BstAPI, EcoRV y ClaI) útiles en la identificación de amplificandos positivos (Figura 22).

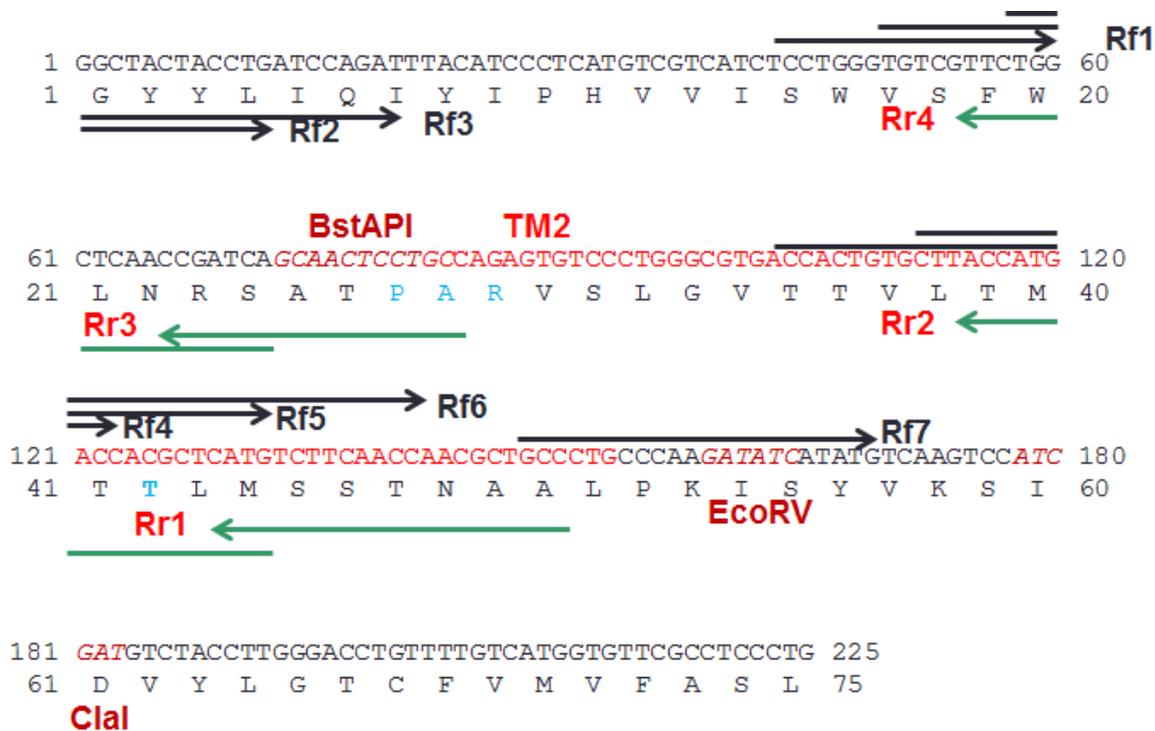


Fig. 22. Secuencia parcial amplificada por la PCR utilizando oligonucleótidos degenerados. Con las flechas negras se señalan las posiciones relativas de los oligonucleótidos en *sentido* y con flechas verdes los sitios para los oligonucleótidos en *antisentido*. La secuencia de nucleótidos correspondiente al dominio TM2 está resaltada en color rojo; los aminoácidos determinantes para la selectividad iónica en color azul; y en cursivas de color café los sitios de restricción para las enzimas BstAPI, EcoRV y ClaI.

Para continuar con la clonación de una subunidad de un GABAR en el acocil, los extremos 5' y 3' del ADNc aislado fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados con base en la secuencia parcial obtenida y siguiendo el protocolo correspondiente para amplificaciones mediante la técnica RACE-PCR (Schaefer, 1995). Subsecuentemente, se amplificaron dos fragmentos hacia ambos extremos de la secuencia, uno de 1,019 pb en dirección 5' y otro de 919 pb hacia 3' (Figura 23A). Los productos obtenidos en ambas reacciones de RACE fueron purificados, clonados en el vector pJET1.2 y secuenciados. Las secuencias correspondientes para los amplicones conseguidos con ambas reacciones RACE-PCR fueron unidas utilizando la aplicación *ContigExpress* del programa *Vector NTI advance 11* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Como ambos productos amplificados contenían una región donde se podían empalmar, esto permitió ensamblarlos para obtener un ADNc completo mediante la técnica de extensión del empalme por PCR (OE-PCR, Ho et al., 1989). El amplificado final (Figura 23B, carril 1) fue ligado en el vector bicistrónico pIRES2-EGFP (Figura 23B, carril 2) utilizando los sitios de restricción para NheI y SacII, posteriormente fue purificado y secuenciado.

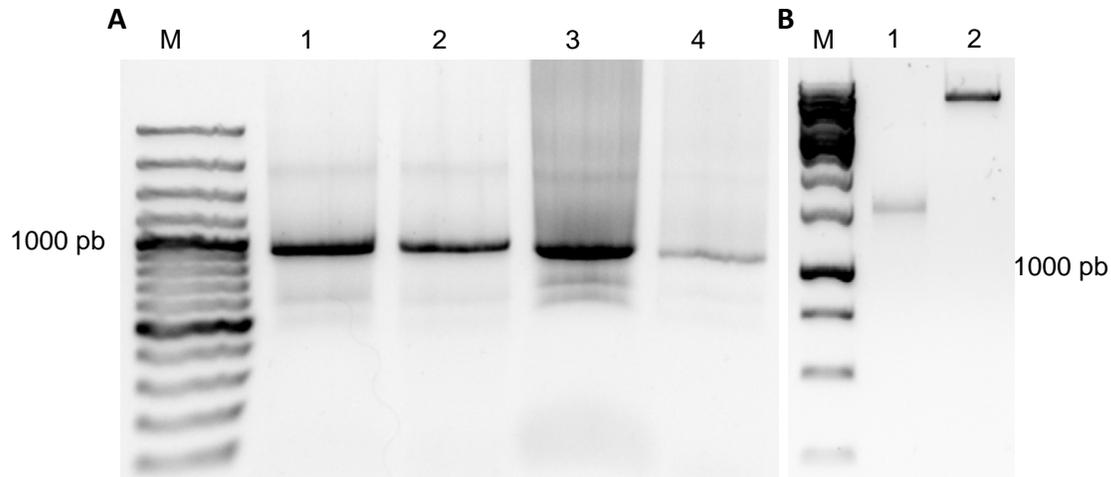


Fig. 23. Fragmentos amplificados por RACE y ADNc final obtenido por OE-PCR. A) Fragmentos amplificados por RACE 5' de 1,019 pb (carriles 1 y 2) y productos obtenidos por RACE 3' con 919 pb (carriles 3 y 4). Cada producto amplificado fue purificado en columna, clonado en el vector pJET1.2 y secuenciado. **B)** Bandas correspondientes al producto final (1.45 kpb) obtenido tras el ensamble de los dos productos de RACE (carril 1) y vector pIRES2-EGFP linealizado (5.3 kpb, carril 2). El ADNc final fue clonado en el vector bicistrónico en los sitios para las enzimas NheI y SacII, posteriormente purificado y secuenciado. Los marcadores de peso molecular para ADN de 100 pb plus (en A) y de 1 kpb (en B), están señalado con la letra M

Una vez que se obtuvo la secuencia del ADNc final, el análisis posterior nos indicó que habíamos clonado una subunidad de un receptor para el GABA (comparado con la secuencia de aminoácidos de la subunidad aislada de *H. americanus*), pero aún sin la certeza de que fuese a formar un receptor funcional. Nosotros la nombramos pcGABA_Aβ y la secuencia fue depositada en la base de datos GenBank (número de acceso KM115031). La longitud total amplificada del pcGABA_Aβ es de 1,930 pb y contiene regiones no traducidas de 74 pb para el extremo 5' y de 395 pb para el extremo 3', así como también un marco de lectura abierto de 1,461 pb. El polipéptido deducido que codifica para una subunidad de un GABA_AR de acocil consta de 486 aminoácidos (Figura 25), posee una masa molecular calculada de 55.08 kD y un punto isoelectrico predicho de 8.38.

Con el fin de analizar la identidad de la subunidad aislada, la secuencia de aminoácidos fue comparada con la base de datos de proteínas utilizando la

herramienta en línea BLASTN para las comparaciones en nucleótidos y BLASTP para las de aminoácidos. Los resultados indicaron que todas las secuencias que producían alineamientos con similitudes significativas pertenecen a subunidades de canales selectivos a cloruro activados por el GABA, siendo la secuencia de la subunidad GABA β de *H. americanus* (número de acceso del GenBank AY098945) la que tuvo un nivel de identidad mayor con respecto a la subunidad que aislamos.

Adicionalmente, para examinar los niveles de expresión de esta subunidad en otros tejidos del acocil *P. clarkii*, se utilizaron amplificaciones por RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos. Para ello se extrajo ARN total de cada tejido y se obtuvo una concentración de (en ng/ μ l): 12 para la médula externa, 14 para la médula interna, 95 para el órgano-X, 66 para lámina ganglionar, 299 para el ganglio cerebroide, 119 para el ganglio torácico, 257 para el ganglio abdominal, 883 para hepatopáncreas y 1200 para músculo.

En casi todas las muestras, el nivel de expresión de pcGABA β es similar, siendo la médula interna la que parece mostrar menor expresión (Figura 24, carril MI). Por el contrario, la médula externa y los diferentes ganglios es donde se observó aparentemente mayor expresión de la subunidad aislada del receptor al GABA (Figura 24, carriles MI, GC, GA y GT). Los productos esperados de 469 pb corresponden a las bandas detectadas en el gel de agarosa que se muestra en la Figura 24.

Si bien el análisis de expresión no es el más preciso, da una idea del grado en que los receptores al GABA pueden estar presentes, y subsecuentemente, el papel que podrían desempeñar de acuerdo al sitio donde estén localizados.

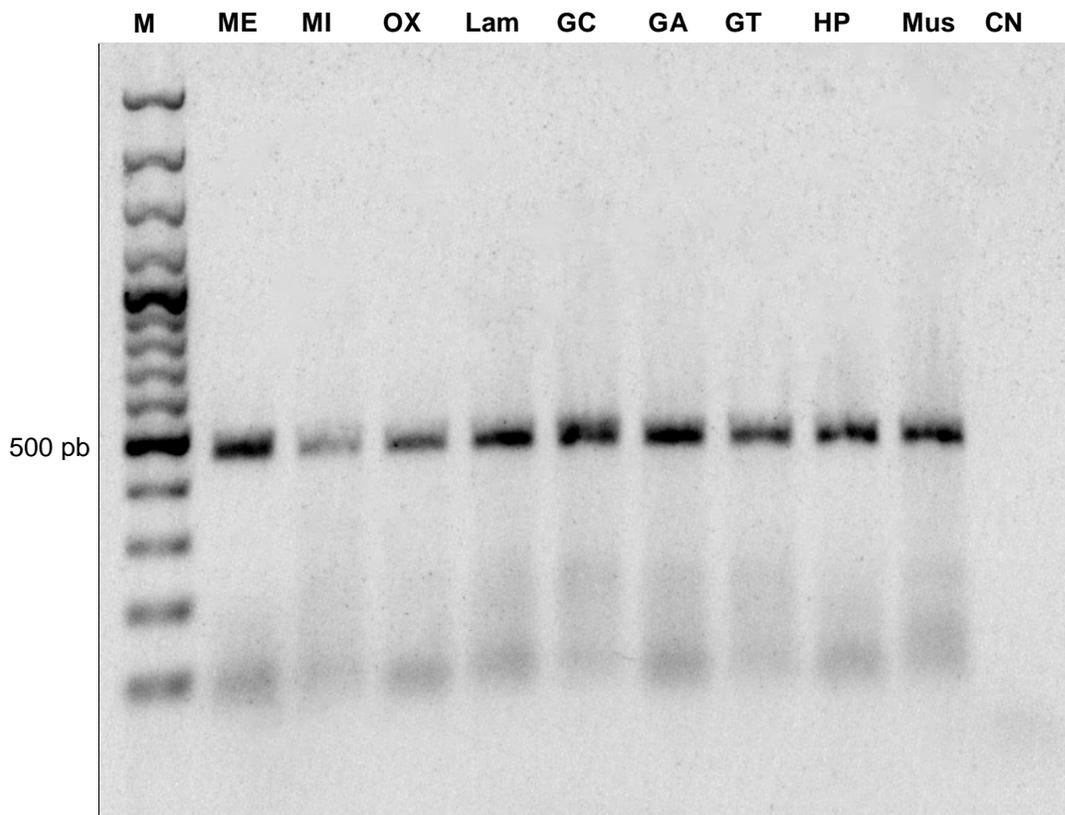


Fig. 24. Expresión de pcGABA_Aβ en varios tejidos de *P. clarkii*. Los fragmentos fueron obtenidos por amplificaciones de RT-PCR. Los productos esperados basados en la posición de los oligonucleótidos son de 469 pb en todos los casos. M, marcador de ADN 100 pb plus; ME, médula externa; MI, médula interna; OX, órgano-X; Lam, lámina ganglionar; GC, ganglio cerebroide; GA, ganglio abdominal; GT, ganglio torácico; HP, hepatopáncreas; Mus, músculo; CN, control negativo. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando las mismas combinaciones de oligonucleótidos.

Características estructurales de la subunidad de un GABAR del acocil

Como se mencionó previamente, comparando la secuencia obtenida con las bases de datos y con alineamientos múltiples de secuencias, el péptido que codifica para una subunidad de un GABA_AR de acocil comparte una similitud del 97% con el producto del gen ortólogo de *H. americanus* y un 63% de identidad con la subunidad RDL de *D. melanogaster* (Figura 25). También, pcGABA_Aβ comparte 35.4% de identidad con la subunidad del receptor a glicina de humano GlyRα, 34% de

semejanza con la subunidad GABA_Aβ3 y 31% con la subunidad GABA_Aρ3, estas dos últimas pertenecientes a rata. El mayor parecido entre las secuencias mencionadas arriba, y con otras subunidades de los GABARs de invertebrados, se localiza en los dominios transmembranales (TM1, en las posiciones 259Y–281L; TM2, en las posiciones 290V–312P; TM3, en las posiciones 322V–344M; y TM4, en las posiciones 451I–468Y; la numeración correspondiente al péptido del acocil; Figura 25). Sin embargo, cuando se compara la secuencia de la subunidad pcGABA_Aβ con la de RDL, se puede notar que existe una gran diferencia en la región del asa intracelular que une a los dominios TM3 y TM4, pues resulta que la subunidad de acocil es 120 aminoácidos más corta. Por otro lado, además de los 4 dominios TM que se encuentran en la subunidad de acocil, existen otras características estructurales altamente conservadas tales como el asa de dicisteínas (*asa-cis*), los extremos amino y carboxilo extracelulares, las asas que separan a los 4 dominios TM y los aminoácidos que definen el sitio de unión al GABA, incluyendo los residuos FGYS y TGN Y encontrados en todas las subunidades β de los GABA_AR (Amin and Weiss, 1993).

pcGABA MRSSGWP-LARLALH-----LLMLLTRSYCSLA~~EV~~MSTYRPAVVKAFET----MTDGNIS 50

haGABA MRSSGWP-LARLALH-----LLVLLTRSYCSLA~~EGP~~-TYRPAVEEAFKT----MTDGNIS 49

dRDL MSDSKMDKLARMAPLPRTPLLTIWLAINMALIAQETGHKRIHTVQAATGGGSMGLGDVNIS 60

*

pcGABA AILDSLQGTGYDKRIRPKYGE~~SHVD~~VGITM~~HIL~~SISLSEVQMDFTLDFYFRQH~~WTD~~PRLS 110

haGABA AILDSLQGTGYDKRIRPQYGE~~SHVD~~VGITM~~HIL~~SISLSEVQMDFTLDFYFRQH~~WTD~~PRLS 109

dRDL AILDSFSVSYDKRVRPNYGGPPVEVGV~~TM~~VLSISSVSEVLMDFTLDFYFRQFW~~TD~~PRLA 120

*

pcGABA FPDRGGLDELTVGSEYLQKI~~WVPD~~TFANEKKS~~YFHT~~TATTSNEMLRITNQK~~VLR~~SIRLT 170

haGABA FPDRGGLDELTVGSEYLQKI~~WVPD~~TFANEKKS~~YFHT~~TATTSNEMLRITNQK~~VLR~~SIRLT 169

dRDL YRKRPGVETLSVGSEFIKNI~~WVPD~~TFVNEKQSYFHIATTSNEFIRVHHS~~GS~~ITRSIRLT 180

*

pcGABA ITASCPMNLQYFPMDRQLCI~~IEIES~~FGYSMDHIRLSWHAGDRSVVIESDVSLPQFRVLGY 230

haGABA ITASCPMNLQYFPMDRQLCI~~IEIES~~FGYSMDHIRLSWHAGDRSVVIESDVSLPQFRVLGY 229

dRDL ITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGY~~TMRDIRYFWRD~~GLSSVGMSS~~EV~~ELPQFRVLGH 240

*

TM1

pcGABA NRKTIISSTS~~TGNY~~SRLLC~~EIMFVRS~~MGYYLIQIYIPSSLIVVISWVSWFLNRSATPARV 290

haGABA NRKTIISSTS~~TGNY~~SRLLC~~EIMFVRS~~MGYYLIQIYIPSSLIVVISWVSWFLNRSATPARV 289

dRDL RQRATEINLTTGNY~~SRLACEIQ~~FVRS~~MGYYLIQIYIP~~SLIVVISWVSWFLN~~RN~~ATPARV 300

TM2 **TM3**

pcGABA SLGVTTVLTM~~TTLMS~~STNAALPKISYVKSIDVYLGT~~CFVMVFAS~~LLEYAAVGYMGKRIQM 350

haGABA SLGVTTVLTM~~TTLMS~~STNAALPKISYVKSIDVYLGT~~CFVMVFAS~~LLEYAAVGYMGKRIQM 349

dRDL ALGVTTVLTM~~TTLMS~~STNAALPKISYVKSIDVYLGT~~CFVMVFAS~~LLEYATVGYMAKRIQM 360

pcGABA RKNRILAIQKMAEQRK----- 366

haGABA RKNRILAIQKMAEQRK----- 365

dRDL RKQRFMAIQKIAEQKQQLDGANQQANPNPNANVGGPGGVGPGGGPGGGVNVGVG 420

pcGABA ---AATLDHSHASQDHPD---HAPKQT-----EVRYK 392

haGABA ---TATLDHSHASQDHPD---HAPKQT-----EVRYK 391

dRDL MGMGPEHGHHGHHAHSHGHPHAPKQTVSNRPIGFSNIQQNVGTRGCSIVGPLFQEVRFK 480

pcGABA LHDPKAHSGGTTLENTING-RADEEAPP----- 420

haGABA LHDPKAHSGGTTLENTING-RADEEAPP----- 419

dRDL VHDPKAHSGGTTLENTVNGGRGGPQSHGPGPGQGGPPGGGGGGGGPPPEGGDPEAA 540

TM4

pcGABA -IANLLPHKDINKGLNKLYG~~CSP~~SIDIKYSRIVFPVCFVCFNLMYWIY~~LHIS~~DDSTGDL 479

haGABA -IANLLPHKDINKGLNKLYG~~CSP~~SIDIKYSRIVFPVCFVCFNLMYWIY~~LHIS~~DDSTEDL 478

dRDL VPAHLLHPGKVKKDINKLLGITPSDIDKYSRIVFPVCFVCFNLMYWIY~~LHV~~SDVVADDL 600

pcGABA IIHNADG 486

haGABA ILHNQEN 485

dRDL VLLGEE- 606

Fig. 25. Comparación de las secuencias de aminoácidos predichas para la subunidad de acocil pcGABA_Aβ, de la langosta *H. americanus* (haGABA) y RDL de *Drosophila* (dRDL). Las secuencias sombreadas muestran regiones con alto nivel de identidad. Los dominios transmembranales están subrayados e identificados por su nombre correspondiente. El asa-*cis* está resaltada en color rojo y los residuos implicados en el sitio de unión al GABA de las subunidades β están indicados por asteriscos; en azul están señaladas las secuencias conservadas que identifican a estas subunidades. Todas las determinantes moleculares encontradas en el dominio TM2 resultaron ser para una subunidad con selectividad aniónica. Asimismo, se puede observar que existe una alta similitud (~ 97%) entre la secuencia de acocil con la de la langosta.

La secuencia de pcGABA_Aβ también contiene un péptido señal de 28 aminoácidos en el extremo amino terminal, 4 sitios putativos de O-glicosilación, 3 sitios de N-glicosilación y 4 sitios de fosforilación (Figura 26A–D). Por otro lado, los análisis de predicción de estructura secundaria demostraron que la secuencia de aminoácidos contiene 339 residuos de α hélices, 265 residuos de hojas plegadas β y 54 residuos de giros β (Figura 26F). Para el caso de la predicción de la estructura terciaria, la cual se basó en el modelo de la subunidad cristalizada del homopentámero GABA_AR-β₃ (Miller and Aricescu, 2014), arrojó un total de 445 residuos modelados (91%) y 8 posiciones (1%) predichas como estructuras desordenadas. La estructura terciaria total se compone principalmente de 4 grandes α hélices que según la predicción de estructura forman los dominios transmembranales y algunas hojas β localizadas después de la región correspondiente al péptido señal en el extremo amino terminal del lado extracelular. Los giros β y las formas irregulares están distribuidas aleatoriamente en toda la estructura. De acuerdo con este modelo, la predicción de la estructura terciaria mostró una subunidad con 31% de α hélices, 26% de hojas β y 41% de estructuras en forma de asa (Figura 26G).

Adicionalmente, construimos un árbol filogenético (Figura 27) donde comparamos a pcGABA_Aβ con otras secuencias de invertebrados depositadas en las bases de datos. Este árbol muestra que la secuencia de aminoácidos de pcGABA_Aβ está más cercana genéticamente hablando con su ortólogo GABA1a encontrado en

H. americanus y que además mantiene una relación no tan distante con las subunidades de receptores para el GABA selectivos a aniones encontrados en insectos, como por ejemplo *P. xylostell*, *A. mellifera*, etc. Asimismo, el análisis filogenético mostró que pcGABA_{Aβ} tiene la divergencia genética más lejana con los receptores al GABA cuya selectividad es catiónica (por ejemplo EXP-1 de *C. elegans*), así como también con las únicas subunidades encontradas en vertebrados capaces de formar receptores homoméricos (por ejemplo GABA_{Aρ} y GABA_{Aβ} de humano).

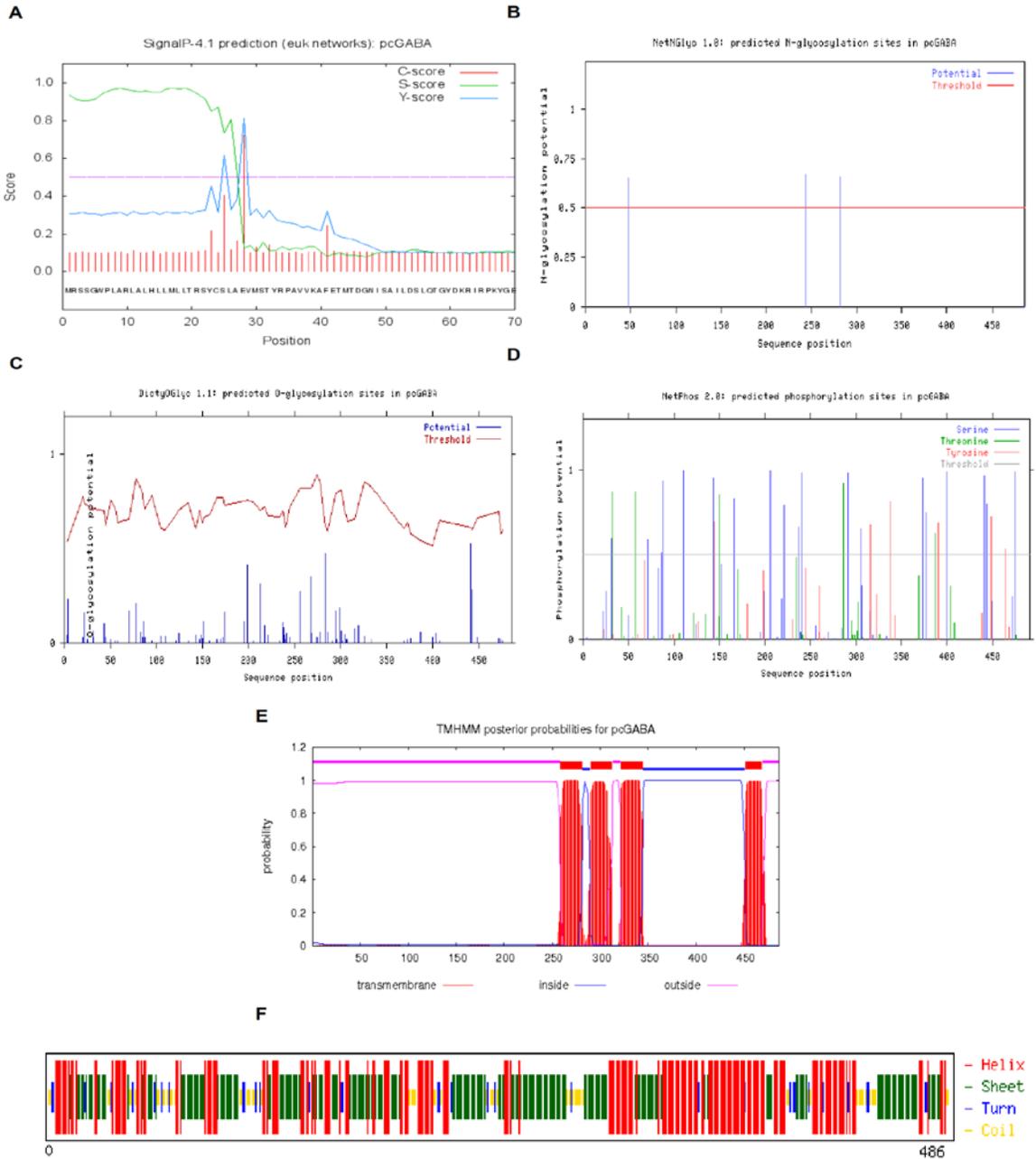
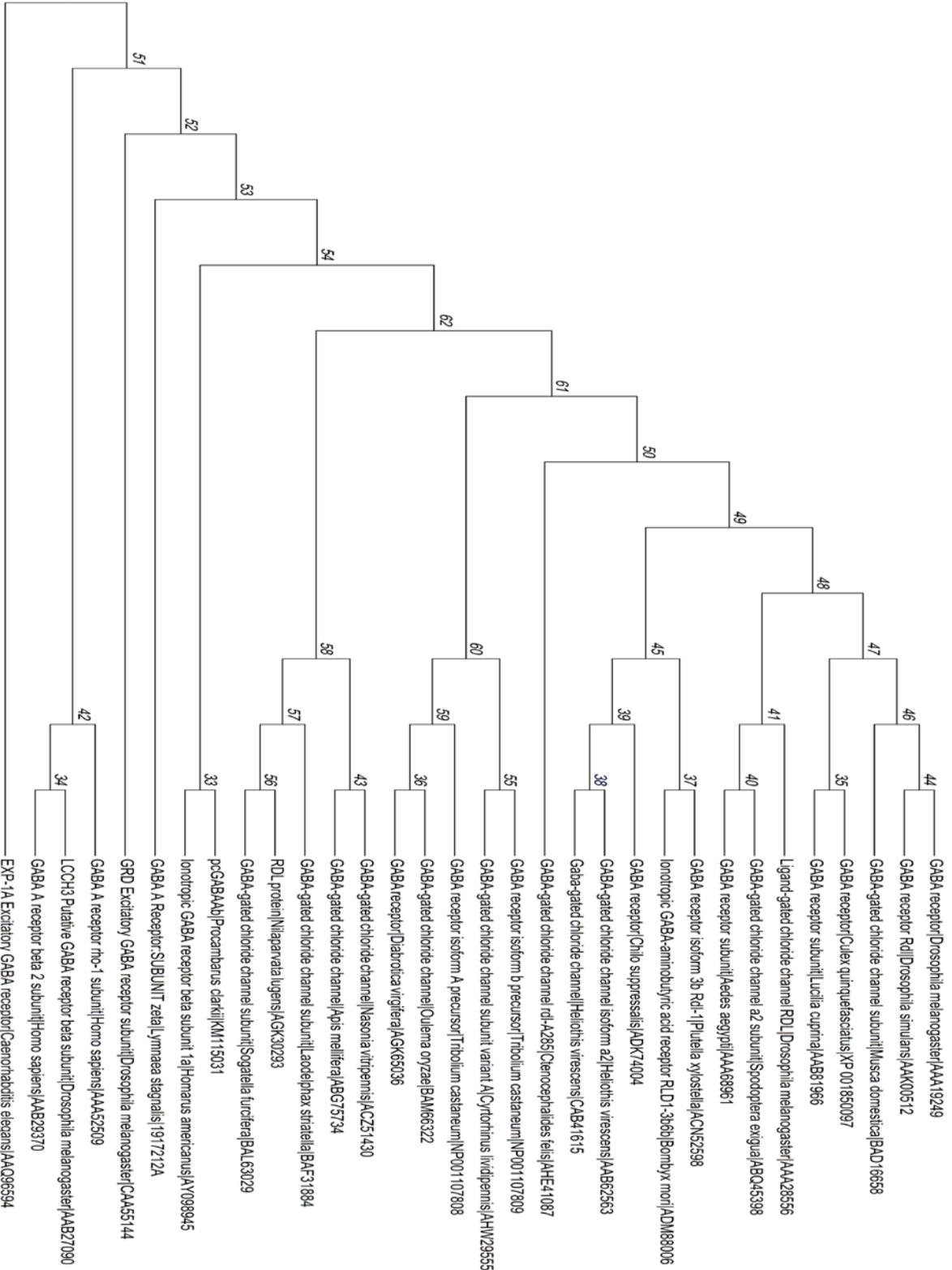


Fig. 26. Análisis de la secuencia de aminoácidos y predicción de estructura de la subunidad pcGABA_Aβ. **A)** Predicción de la porción correspondiente al péptido señal; este contiene un total de 28 aminoácidos. **B)** Predicción de los sitios de *N*-glicosilación; las Asn están predichas para ser glicosiladas en las posiciones 48, 243 y 282. **C)** Predicción de los sitios de *O*-glicosilación; las Thr localizadas en las posiciones 13, 17, 19 y 21 están predichas a ser glicosiladas en la secuencia analizada (GSDWSGVCKITATPAPTPTPTV). **D)** Predicción de sitios de fosforilación. Las Thr 7, Ser 18, Tyr 19 y Tyr 23 están predichas como sitios potenciales de fosforilación. **E)** Predicción de los dominios transmembranales presentes en pcGABA_Aβ. Los 4 dominios existentes se encuentran separados por asas localizadas tanto en el lado intracelular como en el lado extracelular. **F)** Predicción de la estructura secundaria. La secuencia consiste en residuos que forman alfa hélices (mostradas en color rojo), giros aleatorios (en amarillo), hojas beta (en verde) y giros beta (en azul). **G)** Predicción de la estructura terciaria de la subunidad pcGABA_Aβ. El modelaje comparativo de la estructura 3D reveló α -hélices (en rosa), hojas β (en amarillo) y giros irregulares (en gris).



0.2

Fig. 27. Árbol filogenético de las subunidades de receptores al GABA. El análisis filogenético inferido por medio del método Maximum Likelihood (Jones et al., 1992), basado en el modelo matriz JTT, refleja la relación de la secuencia de pcGABA_{Aβ} (KM115031) con otras secuencias de subunidades similares en invertebrados y con las únicas subunidades formadoras de canales homoméricos en vertebrados (GABA_{Aρ}, AAA52509; y GABA_{Aβs} de humano, AAB29370). También, las subunidades formadoras de receptores catiónicos activados por el GABA (GRD de *D. melanogaster*, CAA55144; y EXP-1 en *C. elegans*, AAQ96594) se incluyen en el análisis. Los diagramas filogenéticos iniciales se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Joining y BioNJ en una matriz de distancias pareadas estimadas a partir del modelo JTT; consecuentemente, se seleccionó la topología con el valor logarítmico “likelihood” superior. El árbol consenso con *bootstrap* inferido a partir de 1000 réplicas se tomó para representar la historia evolutiva de los taxa analizados (Felsenstein, 1985). Cada rama correspondiente a las particiones reproducidas en menos del 75 % de réplicas con *bootstrap* están colapsadas. Los números encima de cada rama indican los valores del *bootstrapping*. La escala indica el número de sustituciones de nucleótidos esperadas por sitio por unidad de longitud de rama. El análisis involucró 32 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes se eliminaron, siendo un total de 355 posiciones en el estudio final. El análisis evolutivo fue realizado con el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Los números de acceso al GenBank están indicados al final de cada nombre de las secuencias utilizadas para el análisis.

Detección de los transcritos pcGABA_{Aβ} en el órgano-X por medio de hibridación *in situ*

La presencia de los transcritos de la subunidad pcGABA_{Aβ} en neuronas del órgano-X del acocil se muestra en la Figura 28. Mediante experimentos de HIS, encontramos que la sonda de ARN antisentido marcada con Dig hibridó específicamente al ARNm de la subunidad pcGABA_{Aβ} (Figura 28A–D), lo cual se validó directamente por la ausencia de fondo al usar la sonda en sentido (control negativo, Figura 28E–H). Cuando se capturó la imagen de una preparación del órgano-X entero, se observó que las neuronas de esta región mostraron marca de rodamina (Figura 28A), lo cual dio un indicio de que la señal realmente correspondía a la sonda marcada que había hibridado al ARNm en estudio. Al momento de amplificar la imagen, las señales de hibridación se hicieron visibles a nivel perinuclear, indicando una fuerte presencia del ARNm correspondiente a la

subunidad pcGABA_Aβ (Figura 28C). En algunas células, se encontró que la señal de hibridación fue muy débil, tal vez debido a una baja expresión de pcGABA_Aβ, aunque fue claramente detectable en comparación con el control negativo. En contraste, los experimentos de hibridación *in situ* realizados con la ribosonda en sentido no revelaron ningún tipo de marcaje específico (Figura 28E, G). Ocasionalmente, algunas células tratadas en presencia de la sonda en antisentido no mostraron inmunorreactividad para la subunidad pcGABA_Aβ. Esta variabilidad en el marcaje de la subunidad bajo análisis entre esas neuronas sugiere que el GABA podría regular un subgrupo de neuronas, o que otro tipo de subunidades diferentes a la que aislamos pudieran también estar presentes en diferentes proporciones.

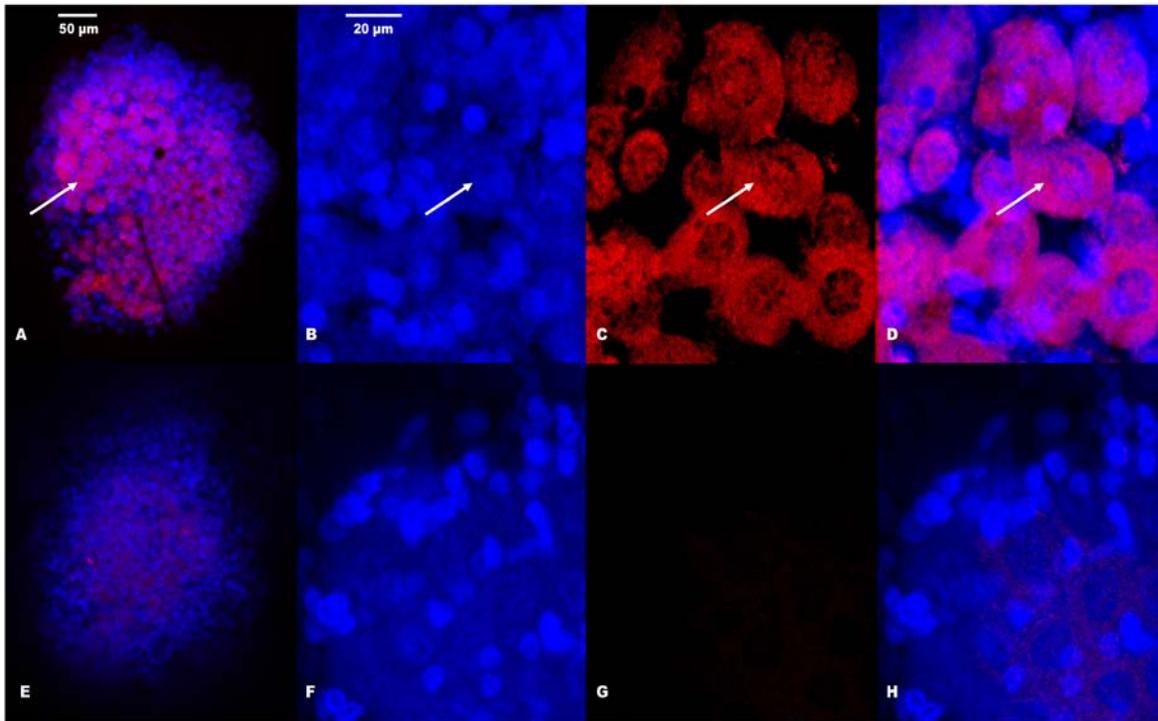


Fig. 28. Hibridación *in situ* para el ARNm-pcGABA_{Aβ} en neuronas del órgano-X de *P. clarkii*.

(A–D) Marcaje del transcrito pcGABA_{Aβ} con la sonda antisentido. **A)** Vista en baja amplificación del órgano-X después de la hibridación. En la imagen, una de las neuronas teñidas con rodamina está señalada con flecha. La coloración azul corresponde a la tinción con DAPI. **B)** Sección óptica amplificada señalando las neuronas contrateñidas con DAPI (flecha). **C)** Neuronas amplificadas donde se observan manchas fluorescentes de rodamina que corresponde al ARNm-pcGABA_{Aβ}. La señal de rodamina positiva se concentró a nivel perinuclear y citoplasmático (flecha). **D)** Superposición de la señal para DAPI y rodamina. **(E–H)** Control negativo de la hibridación *in situ* para la subunidad pcGABA_{Aβ}. **E)** Vista panorámica del órgano-X en presencia de la ribosonda sentido marcada con rodamina. **F)** Neuronas teñidas con DAPI resaltando el núcleo celular. **G)** Imagen amplificada de las neuronas bajo estudio resaltando la ausencia de señal para el marcador fluorescente. La ribosonda sentido marcada con rodamina no mostró señal detectable. **H)** Superposición de los dos canales diferentes. La escala en A y en E corresponde a 50 μm. Para B–D y F–H, la escala es la misma (20 μm). Todas las imágenes se obtuvieron de manera separada después de visualizarlas con filtros apropiados para DAPI y rodamina, una vez realizado esto las imágenes fueron procesadas.

Expresión funcional y propiedades farmacológicas de la subunidad pcGABA_Aβ

El análisis de secuencia mostró que la subunidad de un GABA_AR del acocil podría formar un dominio de unión al GABA, el cual se relaciona en gran medida con un poro permeable a aniones. Por consiguiente, esto sugiere que la subunidad aislada formadora de receptores puede ser afectada al menos por el GABA, y quizá por bloqueadores de poro. Cuando se aisló la subunidad pcGABA_Aβ era difícil suponer que podría formar receptores funcionales. Sin embargo, la única manera de saberlo era analizar las propiedades de la proteína que se expresa a partir del ADNc aislado mediante registros electrofisiológicos en célula completa. Para ello se realizó la transfección transitoria en células HEK 293T (Figura 29) con una incubación de 24 a 72 h antes de su uso. La transfección de pcGABA_Aβ dio como resultado corrientes robustas de cloruro activadas por el GABA, dependientes de la concentración y del potencial de membrana utilizado, que además no mostraron desensibilización. Con estos resultados, resultó interesante observar si otros agonistas de receptores al GABA ionotrópicos (muscimol y *c*-ACA) podrían tener efecto en los canales formados por la subunidad aislada.

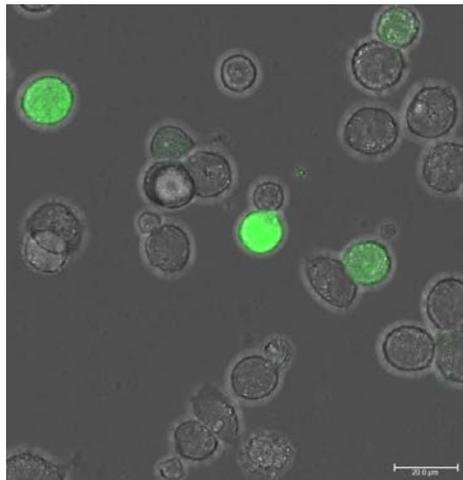


Fig. 29. Células HEK transfectadas con pcGABA_Aβ. En color verde se muestran las células transfectadas con la subunidad aislada del GABA_AR.

Con las concentraciones del GABA utilizadas (en células independientes) se construyó la curva concentración–respuesta del receptor expresado, la cual se ajustó con la ecuación de Hill, arrojando un coeficiente de Hill (n_H) de 0.8 y una EC_{50} de 31 μM (Figura 31A). Sin embargo, era necesario analizar los parámetros de otros agonistas, y así poder tener una idea más clara sobre cómo es la afinidad de cada uno, incluso considerar si la cooperatividad difiere mucho entre éstos.

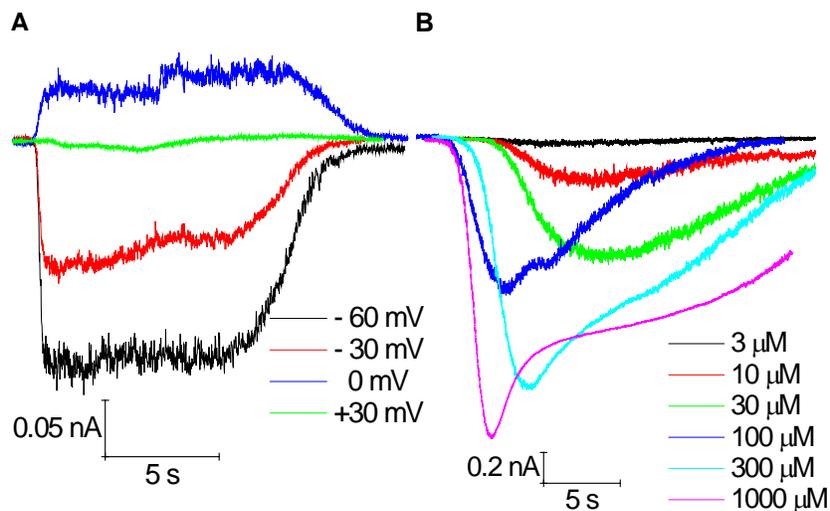


Fig. 30. Corrientes activadas por el GABA en células HEK transfectadas con pcGABA_Aβ.
A) Corrientes evocadas por el GABA (10 μM) a diferentes potenciales de membrana; es importante notar que las corrientes transitorias observadas en las neuronas del órgano–X no se encuentran expresadas. **B)** Corrientes evocadas (– 60 mV) por el GABA a las concentraciones señaladas. Concentraciones mayores del agonista no produjeron respuestas más grandes a las vistas en los registros mostrados.

Como se ha visto en receptores de invertebrados, la acción de agonistas de los GABA_ARs y de los GABA_ρ suele ser indistinta; es decir, estos receptores pueden tener propiedades farmacológicas de ambos. Algo parecido observamos con pcGABA_Aβ, al analizar los efectos del muscimol y del c–ACA, encontramos que ambos evocaban corrientes entrantes dependientes de la concentración utilizada, y contrario a los estudios con el GABA, no logramos saturar las respuestas para los otros dos agonistas debido a los límites de solubilidad que estos presentan

(Figura 31B–C). Cuando se hicieron los ajustes de las curvas concentración–respuesta, los datos resultantes indicaron que el orden relativo de la potencia de los agonistas para el GABA_AR de acocil fue el siguiente: GABA (31 μM) > *c*–ACA (97 μM) > muscimol (133 μM), con $n_H = 0.9$ y $n_H = 1.1$ para el *c*–ACA y el muscimol, respectivamente (Figura 31A–C).

Asimismo, las amplitudes de las corrientes al pico promediadas inducidas por el GABA (10 μM) fueron -0.7 ± 0.2 nA; mientras que en el caso de las corrientes al pico promediadas para el muscimol y el *c*–ACA fueron -0.3 ± 0.07 nA y -1.4 ± 0.2 nA, respectivamente; como vemos para el agonista de los receptores GABA_ρ (*c*–ACA), las corrientes resultaron ser casi 2 veces más grandes en comparación con las evocadas por el GABA.

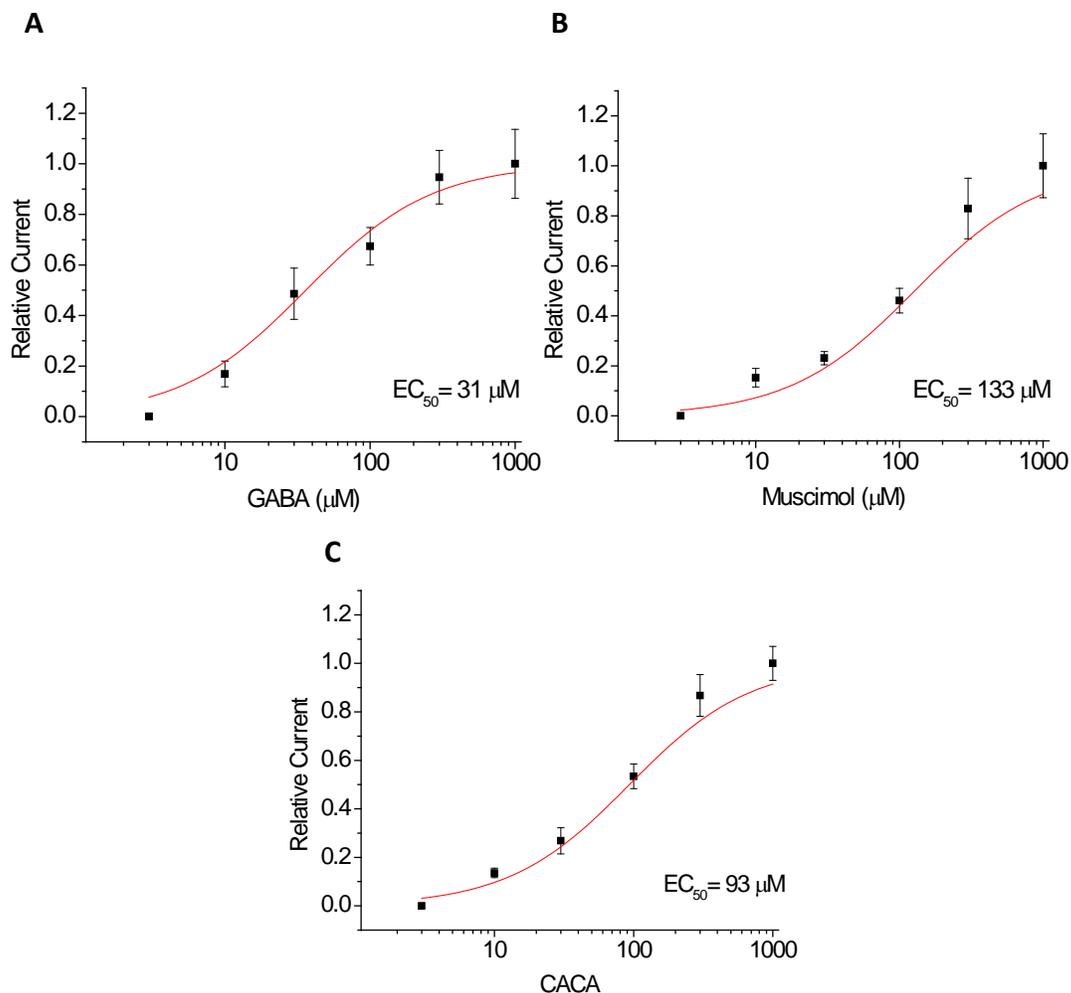


Fig. 31. Curvas concentración–respuesta para los agonistas GABA, muscimol y c–ACA del receptor al GABA expresado en células HEK. Se utilizaron concentraciones de 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μM . Todas las corrientes fueron obtenidas utilizando un potencial de mantenimiento de -60 mV y normalizadas al valor máximo de la corriente obtenido a 1000 μM . Los datos fueron ajustados con la ecuación de Hill de 4 parámetros. Los valores de las EC_{50} para los agonistas se muestran en cada curva, y los números de Hill resultantes fueron: 0.8 para el GABA, 0.9 para el muscimol y 1.1 para el c–ACA. Cada punto representa la media \pm EE de al menos 6 células; en algunos casos hasta 16 células fueron analizadas.

El hecho de que el n_H para el GABA haya sido <1 , podría indicarnos que existe una cooperatividad negativa de la unión del GABA a su receptor y, por tanto, pudiera ser la responsable de que las amplitudes de las corrientes fuesen más pequeñas en comparación con las registradas utilizando los otros agonistas. Posteriormente, una

vez obtenidos los valores de las EC_{50} para cada agonista, estas concentraciones fueron aplicadas para evocar corrientes a V_m de -60 mV en una sola célula. Una vez más, el α -ACA indujo corrientes más grandes en comparación con las evocadas por el GABA y muy similares a las obtenidas por el muscimol (Figura 32). Por otro lado, las corrientes inducidas por el GABA fueron abolidas utilizando $100 \mu\text{M}$ de picrotoxina, un bloqueador de poro de canales de cloruro activados por el GABA (Qian et al., 2005), cuando se co-aplicaban con $31 \mu\text{M}$ del GABA (Figura 32A), lo cual demuestra que el sitio de unión a este ligando está conservado. En contraste, la bicuculina, un antagonista competitivo para los GABA_ARs (Ueno et al., 1997; Johnston, 2013), no produjo ningún efecto en la respuesta al GABA o a los otros dos agonistas (Figura 32B). Esto resulta interesante debido a que los residuos implicados en la unión del GABA están altamente conservados en la subunidad aislada.

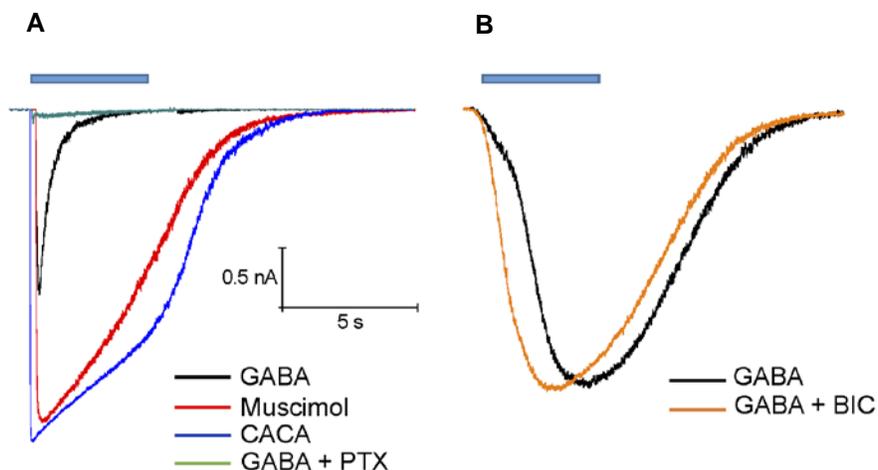


Fig. 32. Corrientes activadas por el GABA en células HEK que expresan a pcGABA_Aβ. **A)** Trazos representativos de corrientes inducidas por aplicaciones durante 5 s de los agonistas probados a los valores EC_{50} calculados previamente. El bloqueador de poro picrotoxina (100 μ M) abolió las corrientes evocadas por el GABA (en color verde). **B)** Efecto de la bicuculina en las corrientes activadas por el GABA (10 μ M). El antagonista competitivo (100 μ M, en color naranja) no fue capaz de bloquear las corrientes evocadas por la aplicación del agonista. El potencial de membrana utilizado fue de -60 mV.

Adicionalmente, para identificar farmacológicamente las corrientes obtenidas en las neuronas del órgano-X, y considerando que una corriente activada por el GABA es dependiente de cationes, buscamos un bloqueador de receptores catiónicos y analizamos su efecto en las corrientes. Para ello usamos mecamilamina, un antagonista de los receptores neuronales a acetilcolina nicotínicos (Papke et al., 2001). Cuando aplicamos el antagonista a una concentración de 100 μ M junto con el GABA a la célula bajo estudio, el efecto inmediato no ocurrió sobre la amplitud de la corriente, sino que se prolongó la fase del cierre del receptor; es decir, parece que este fármaco tiene un efecto sólo en la cinética de inactivación (Figura 33A).

Por otro lado, con la acción de la mecamilamina observada en las corrientes evocadas por el GABA en las neuronas del órgano-X, decidimos analizar el efecto que pudiera tener en las corrientes dadas por la subunidad aislada de acocil y expresada en células HEK. Curiosamente el efecto observado previamente se reprodujo de manera muy similar; esto es, la corriente se enlenteció en la fase de

inactivación del receptor (Figura 33B), lo cual sugirió que este canal podría tener sitios a otros moduladores del *gating* del receptor que hasta la fecha se sabía que se encontraban en receptores específicos.

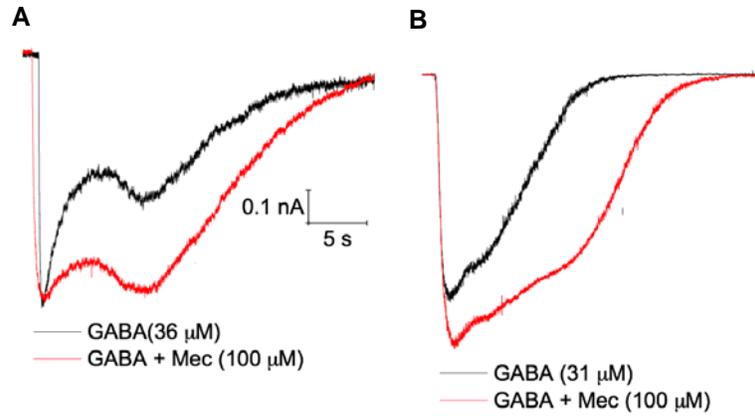


Fig. 33. Efecto del bloqueador de canales catiónicos mecamilamina. A) Corrientes evocadas (-60 mV) por el GABA en neuronas del órgano-X. **B)** Corrientes aisladas activadas por el GABA en células HEK. Las corrientes registradas en ambos tipos celulares fueron altamente resistentes al bloqueo por mecamilamina. Sin embargo, esta fue capaz de prolongar la fase de inactivación. Las corrientes fueron evocadas aplicando la EC_{50} del GABA únicamente y en conjunto con 100 μM del antagonista.

DISCUSIÓN

En invertebrados existe una gran diversidad de canales iónicos activados por ligando que han sido explorados farmacológica y molecularmente (Ffrench-Constant et al., 1991; Zhainazarov et al., 1997; Hollins and McClintock, 2000; Witte et al., 2002). Muchos de ellos son receptores permeables a aniones que funcionan de manera similar a los canales que se han descrito en vertebrados. Sin embargo, existen unos cuantos que han sido reportados con características especiales en el poro de permeabilidad, lo cual permite que estos receptores no actúen como inhibidores sino como excitadores (Beg and Jorgensen, 2003; Gisselmann et al., 2004).

Lo anterior es muy diferente a lo que se ha sido descrito en vertebrados, donde la acción excitadora puede existir si los transportadores que modifican el E_{Cl^-} están expresados de manera diferente; por ejemplo, las neuronas inmaduras y las neuronas del ganglio de la raíz dorsal expresan principalmente el co-transportador $Na^+-K^+-2Cl^-$ (NKCC1) y en menor medida el co-transportador K^+-Cl^- (KCC2), incrementando la concentración intracelular de Cl^- . Lo anterior lleva a un flujo saliente de cloruro causado por el GABA e inmediatamente la despolarización de la membrana plasmática (Stein and Nicoll, 2003).

Esos hallazgos experimentales han ayudado a entender de qué manera el GABA consigue funcionar como neurotransmisor excitador en el sistema nervioso. Pero, ¿puede el GABA operar como neurotransmisor excitador en las células del órgano-X? Cuando se realizaron estudios en las neuronas neurosecretoras del acocil, García y colaboradores encontraron que el GABA puede evocar una despolarización lenta que resulta en una actividad de disparo en células que previamente eran silentes (García et al., 1994). También, otros neurotransmisores como la glicina y la taurina identificados en el tallo ocular del acocil, pueden inducir un efecto excitador en la neuronas del órgano-X (García et al., 1991). Por otro lado, en un organismo estrechamente relacionado al acocil (el cangrejo *Cancer borealis*), se encontró que en las neuronas del ganglio estomatogástrico el GABA puede

evocar una despolarización sensible a la PTX con un potencial de inversión alrededor de -40 mV (Swensen et al., 2000). Adicionalmente, hace varios años en el cangrejo *Cancer pagurus* se mostró que el GABA puede activar dos respuestas inhibitoras diferentes, una mediada por Cl^- y otra por K^+ . Sin embargo, los experimentos de sustitución iónica no pudieron revelar si las respuestas observadas dependían de un ion en específico (Marder and Paupardin-Tritsch, 1978).

Viendo la gran diversidad de genes que codifican canales iónicos con amplias características farmacológicas y funcionales, no resulta tan descabellado pensar que un neurotransmisor cumpla con varias o diferentes funciones en determinados ambientes celulares. Lo anterior sigue manteniendo la idea de continuar en la búsqueda de proteínas con características especiales que permitan un mayor entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a los sistemas orgánicos. Probablemente en el genoma de los vertebrados muchas de las proteínas encontradas en invertebrados permanecen ocultas, y quizá puedan funcionar sólo en ciertas etapas del desarrollo, o en algunas condiciones fisiológicas.

Los estudios llevados a cabo en *P. clarkii* pueden dar una idea sobre como son reguladas las acciones del GABA, desde el punto de vista en que puede generar excitabilidad, hasta la evidencia de como una subunidad puede formar por si misma receptores funcionales con características farmacológicas que se encuentran por separado en vertebrados, o en receptores de otra naturaleza.

Dos posibles tipos de subunidades de receptores al GABA podrían mediar las respuestas a este neurotransmisor en las neuronas del órgano-X

En las neuronas del órgano-X del acocil *P. clarkii* identificamos dos tipos de corrientes activadas por el GABA, una transitoria y otra sostenida. Esta ultima refleja las respuestas usuales que se le han atribuido desde hace mucho tiempo al GABA, mientras que la otra parece manifestar la actividad despolarizante observada tanto en *C. elegans* como en *D. melanogaster*. En los estudios de sustitución iónica, las corrientes sostenidas se eliminaban al momento de realizar los registros bajo

condiciones de cero Cl^- , lo cual revelaba una alta dependencia de las corrientes analizadas a este anión. Adicionalmente, otra evidencia que apoyó lo previamente descrito fue que en la curva corriente voltaje la corriente sostenida se invirtió alrededor de -45 mV, lo que corresponde al V_{rev} para el cloruro en esas células. Con lo anterior se puede decir que las corrientes con dependencia al cloruro son capaces de mediar las respuestas de naturaleza inhibitoria en las células bajo estudio.

Como habíamos visto, el GABA era capaz de evocar corrientes robustas con dos componentes. Observando la naturaleza de las corrientes no era difícil pensar que el muscimol tuviese un comportamiento similar. Sin embargo, ¿era posible que un agonista de los receptores GABA_ρ tuviera un efecto positivo en estas neuronas? De manera interesante, el c -ACA fue capaz de evocar corrientes bien marcadas que no eran afectadas por la bicuculina. Con estos datos, en un principio se pensó que la subunidad responsable era del tipo “ ρ ” formando canales homoméricos (Zhainazarov et al., 1999), pero eso era sólo una parte de la farmacología de los receptores GABA_ρ . En un intento por completar este perfil farmacológico, se decidió utilizar un bloqueador selectivo de estos canales, y para ello se utilizó el antagonista TPMPA (Johnston et al., 2010). Sin embargo, al aplicarlo en las corrientes evocadas por el c -ACA o el GABA no se observó ningún efecto. Estas acciones nos recuerdan que muchos de los receptores encontrados en invertebrados pueden diferir de los descritos en vertebrados, pero aun así, su efecto final puede ser el mismo. En vista de que el perfil farmacológico no es consistente con lo que está definido para los GABARs ionotrópicos, ha resultado difícil determinar si algún receptor GABA_A o un GABA_ρ es el responsable de mediar las respuestas dependientes de cloruro evocadas por el GABA en estas neuronas.

Por otro lado, los estudios de sustitución iónica también arrojaron datos interesantes acerca de la corriente transitoria activada por el GABA, la cual podría generar despolarización. Los receptores responsables de la actividad excitadora del GABA en esas neuronas probablemente sean miembros de la familia de receptores al

GABA, pero no del tipo que son selectivos a aniones y que median respuestas fisiológicas inusuales debido a cambios en el E_{Cl^-} (Cherubini et al., 1991), sino aquellos que participan en los fenómenos de excitabilidad activando conductancias catiónicas, tal como se ha descrito en otros sistemas (Beg and Jorgensen, 2003; Gisselmann et al., 2004). Cuando las corrientes entrantes transitorias fueron abolidas en solución libre de Na^+ , la idea inmediata fue que este catión es el principal acarreador de cargas a través de los receptores que median este tipo de corrientes y, por consiguiente, se puede pensar que el GABA a este nivel puede actuar como un neurotransmisor excitador. Una de las acciones excitadoras del GABA en muchas neuronas en desarrollo o maduras de vertebrados puede ser debida al flujo de iones bicarbonato; es decir, las respuestas inhibitoras del GABA son seguidos por eventos de excitabilidad mediados por este anión (Perkins and Wong, 1996). En nuestro caso, esta actividad excitadora no puede ser atribuida a tal acción porque la solución salina utilizada en todos los experimentos carecía de compuestos que contuvieran bicarbonatos. Además, un punto que favorece la idea de que las respuestas observadas pueden deberse a receptores con selectividad catiónica, es que las corrientes analizadas son altamente dependientes de Na^+ .

En los GABARs funcionales de vertebrados se ha descrito que se requieren ciertos residuos encontrados en las subunidades α y β para formar el sitio de unión al GABA, algo diferente de lo que sucede en los receptores $GABA_{\rho}$ donde un sólo tipo de subunidad puede formar receptores homoméricos funcionales (Olsen and Sieghart, 2008). Por lo tanto, es posible que las respuestas encontradas en las neuronas del órgano-X requieran de la existencia de dos tipos de canales iónicos activados por el GABA, probablemente receptores diferentes ya sea de los de tipo aniónico o del tipo catiónico, con el ensamble de una o más subunidades. De manera interesante, sólo las respuestas activadas por el GABA y el muscimol fueron sensibles a los experimentos de sustitución de Na^+ , lo cual no sucedió con las corrientes evocadas por el c-ACA, que únicamente se ven afectadas si los iones Cl^- son reemplazados. Lo anterior sugiere fuertemente que la naturaleza y

composición de subunidades de los receptores endógenos pueden ser diferentes entre ellos.

Volviendo al punto donde el GABA se propone como neurotransmisor excitador, el primer canal catiónico activado por el GABA fue descrito en el nematodo *C. elegans*, el cual resultó ser homomérico, activado también por el muscimol y el *c*-ACA, pero insensible a la PTX (Beg and Jorgensen, 2003). En el acocil, también los agonistas utilizados en el análisis de EXP-1 fueron capaces de evocar corrientes, pero a diferencia de este receptor, en las neuronas del órgano-X el antagonista PTX si fue capaz de bloquear las corrientes inducidas. Tales resultados dan paso a la premisa de que el receptor que media la dependencia a Na⁺ podría estar formado por un sólo tipo de subunidad. De manera alternativa, el receptor de tipo catiónico también podría estar formado por más de un tipo de subunidad, tal como se ha descrito en *D. melanogaster*, donde la combinación de dos subunidades diferentes de receptores a activados por ligando resultó en un canal catiónico activado por el GABA, y que además es altamente sensible a la PTX (Gisselmann et al., 2004). Con base en esos datos, no es posible determinar con certeza la diferencia entre las subunidades de los GABARs involucradas en las corrientes transitorias y sostenidas evocadas por los agonistas específicos. Lo importante a considerar es que los estudios en las acciones excitadoras e inhibitoras del GABA se han enfocado en el poro del receptor, donde las determinantes moleculares definen la selectividad iónica (Moorhouse et al., 2002; Goillard and Marder, 2003). Esto hace necesario una evaluación más profunda de transcritos que resulten en subunidades formadoras de los GABARs y que, además, contengan cada aminoácido necesario en la región del dominio TM2 que definan un comportamiento en específico, es decir, que por sí solas o en conjunto formen receptores cuya actividad se restrinja a una acción despolarizante o hiperpolarizante. También resulta atractivo notar que ambas corrientes analizadas en las neuronas del órgano-X fueron sensibles a la PTX, lo que sugiere que los receptores expresados en estas neuronas deberían contener al menos una subunidad β , puesto que la composición del receptor determina la sensibilidad a la PTX y a la bicuculina, donde la subunidad β ha sido

definida como la responsable de mediar estas acciones (Sigel et al., 1989; Zhang et al., 1995; Dibas et al., 2002).

Los estudios acerca de las subunidades de los GABARs en invertebrados son limitados, excepto para la subunidad RDL de *Drosophila*. Por lo tanto, un estudio más enfocado en las características estructurales de los GABARs resultaría importante para tener mejores ideas de cómo funcionan estos receptores, y además porque las proteínas en mención pueden ser usadas como blancos importantes para fármacos.

El análisis de predicción estructural de la subunidad clonada prevé que pertenece a un miembro de la familia de receptores ionotrópicos para el GABA selectivos a aniones

Con las respuestas observadas en las células neuroexcretoras de *P. clarkii*, se hizo necesario un análisis molecular que nos permitiese explicar la naturaleza de los receptores responsables. Aquí reportamos una secuencia de ADNc que codifica un péptido que incluye todas las marcas estructurales de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, específicamente de la familia del asa-*cis*. Esto quiere decir que incluye una región con 15 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que a su vez forman el asa de dicisteínas. También, los cuatro dominios transmembranales predichos vienen como parte de la estructura, donde el segundo dominio que forma el poro de selectividad posee las determinantes moleculares de un receptor activado por ligando cuya selectividad parece restringirse sólo a aniones. Adicionalmente, esta secuencia incorpora las diferentes asas intra- y extracelulares encargadas de unir a los dominios transmembranales, dentro de las cuales un asa de gran tamaño localizada en la parte intracelular que une a los dominios TM3 y TM4, se ha involucrado en eventos de unión proteína-proteína, así como también en modificaciones postraduccionales (Moorhouse et al., 2002). La secuencia de aminoácidos de pcGABA_Aβ comparte un alto grado de conservación con la obtenida en *H. americanus*, la cual contiene prácticamente las mismas regiones putativas ya descritas en la subunidad que aislamos; por ejemplo, incluye

los 4 dominios TMs, el péptido señal localizado en el extremo amino, varios sitios tanto de *N*-glicosilación como de fosforilación, el asa-*cis* y los dominios de unión al GABA (Hollins and McClintock, 2000).

Analizando en conjunto la homología de la secuencia de aminoácidos y la estructura 3D simulada de la subunidad del GABAR de *P. clarkii*, es probable que esta clona comparta una organización terciaria similar a la de otros receptores de invertebrados (tales como *Apis mellifera* ABG75734, *Nilaparvata lugens* ABG75734, *Nasonia vitripennis* AGK30293, etc.), donde el porcentaje de identidad en la secuencia es > 80%. Como en todos los receptores descritos en invertebrados, la estructura de pcGABA_{Aβ} está embebida en la membrana plasmática a través de los 4 dominios TMs, permitiendo el flujo iónico en el poro de permeación una vez que el ligando se ha unido en otros dominios conservados (hojas β en la estructura terciaria) (Mercado and Czajkowski, 2006).

Los diferentes grados de identidad de los receptores al GABA encontrados en otros invertebrados con el descrito en *P. clarkii* pueden estar relacionados directamente. Todos los alineamientos múltiples realizados con las secuencias de aminoácidos de diferentes especies de invertebrados demostraron que la región más conservada estuvo principalmente en las posiciones localizadas después del péptido señal en el extremo amino. Sin duda, la información que brinda la secuencia del péptido correspondiente a pcGABA_{Aβ} puede ser de gran ayuda para el entendimiento de la regulación en algunos procesos fisiológicos de *P. clarkii*, principalmente en aquellos donde el GABA parece cumplir acciones duales.

Con el análisis de la expresión de pcGABA_{Aβ} por RT-PCR, el patrón observado en cada tejido indicó que este receptor se encuentra principalmente en las neuronas del órgano-X y en los ganglios, con un nivel de expresión menor en la médula interna. En parte esto concuerda con el estudio realizado en *H. americanus*, donde la subunidad aislada se localiza principalmente en el "cerebro", órgano olfatorio y en menor cantidad a nivel del tallo ocular (Hollins and McClintock, 2000). Nuestros resultados corresponden con la distribución del sistema nervioso en estos

organismos, pero falta por precisar la diferencia que existe en cuanto a la expresión en cada tejido analizado, así como el papel que pudieran desempeñar. Lo que resultaría más atractivo, tomando en cuenta que este acocil se ha considerado como plaga, es analizar el patrón de expresión en las diferentes etapas de su desarrollo. Es así como podría encontrarse el mejor estadio donde pudiera controlarse usando a pcGABA_{Aβ} como blanco farmacológico de pesticidas.

Marcaje del ARNm de la subunidad del receptor al GABA aislada en neuronas del órgano-X

La evidencia proporcionada por los experimentos de hibridación *in situ* con la ribsonda antisentido reveló que el ARNm-pcGABA_{Aβ} se encuentra en las células neurosecretoras del órgano-X del tallo ocular en el acocil. Sin embargo, no sabemos si otras subunidades de los GABA_ARs co-localizan en las mismas neuronas. La distribución del marcaje específico e intenso a nivel perinuclear/citoplasmático del ARNm-pcGABA_{Aβ} observado en las neuronas analizadas sugiere que el GABA media una gran variedad de funciones en el tallo ocular del crustáceo. Un ejemplo de esas funciones es que el GABA podría actuar directamente en las neuronas pcGABA_{Aβ} positivas, generando las corrientes sostenidas activadas por los agonistas de los GABA_ARs observadas en los registros electrofisiológicos previamente mostrados, más que por otras vías. Además, los experimentos farmacológicos con los agonistas de los GABA_ARs en las neuronas del órgano-X son consistentes con la distribución del ARNm-pcGABA_{Aβ} en esos tipos celulares, aunque otras subunidades de receptores al GABA que no fueron evaluadas en este estudio pueden estar involucradas en la generación de las corrientes transitorias selectivas a cationes.

Adicionalmente, cuando analizamos las imágenes adquiridas con el microscopio confocal, nos dimos cuenta que algunas células del órgano-X no mostraron señal en los experimentos donde se usó la ribsonda antisentido marcada con Dig. Este resultado podría ser debido a las diferencias en la abundancia del mensajero pcGABA_{Aβ} entre esas células. También, la ausencia de pcGABA_{Aβ} o presencia de

otras subunidades debería considerarse; incluso, que también existan diferentes sensibilidades de la ribosonda al ARNm podría ser una opción a considerar.

Los datos presentados aquí muestran que el GABA ejerce una acción en las neuronas del órgano-X, y que los efectos son mediados, al menos en parte por los receptores pcGABA_{Aβ}. En resumen, los resultados de los experimentos de HIS establecen cuales células sintetizan la proteína pcGABA_{Aβ} y que además contribuyen a los efectos finales del GABA en esas células neurosecretoras.

La subunidad de acocil aislada provee ideas de como el GABA puede mediar las corrientes dependientes de cloruro observadas en las neuronas del órgano-X

Las características mencionadas previamente y que están presentes en la proteína codificada por el ADNc aislado fueron confirmadas mediante la expresión funcional en células HEK 293T. La subunidad pcGABA_{Aβ} aislada fue definida como formadora de canales de cloruro activados por el GABA, y probablemente explique una de las dos corrientes observadas en las neuronas del órgano-X de *P. clarkii*. El perfil farmacológico de las corrientes dependientes de cloruro analizadas en las células HEK no parece corresponder al observado en los receptores GABA_A o en los GABA_ρ. De hecho, los datos obtenidos tras la expresión funcional nos dicen que hemos aislado una nueva subunidad de receptores homoméricos activados por el GABA, así como también por el muscimol y el *c*-ACA. De manera interesante, el n_H para la respuesta al GABA fue < 1 (0.8), indicando que existe cooperatividad negativa de unión del GABA a su receptor. Por tanto, este ligando podría tener baja afinidad, o una cinética de disociación más rápida en los receptores homoméricos expresados. Para los demás agonistas no fue así, lo que es consistente con la amplitud de las respuestas evocadas, las cuales fueron mayores en comparación con el GABA. Esas respuestas fueron bastantes similares a las corrientes sostenidas encontradas de manera nativa en las neuronas del órgano-X, y las pocas diferencias que pudieran existir en el perfil farmacológico puede ser explicado

considerando subunidades adicionales (heteromultímeros) en los receptores nativos.

Aunque la secuencia de la subunidad aislada se asemeja a otras subunidades aniónicas, no hay certeza sobre como clasificarla (ya sea α , β u otro gen de la gran diversidad de subunidades de estos receptores). Su secuencia comparte gran identidad con la subunidad de un GABAR aislada de la langosta *H. americanus*, definida como β debido a su habilidad para formar canales homoméricos (Hollins and McClintock, 2000). Algo similar sucede con las subunidades aisladas de *Drosophila*, las cuales son clasificadas también como “tipo- β ” porque son capaces de formar canales funcionales con un sólo tipo de subunidad, aunado al hecho de que también contienen secuencias conservadas (FGYS y TGNV) encontradas sólo en este tipo de subunidades (Amin and Weiss, 1993; Chen et al., 1994). Estas propiedades han sido determinantes para poder lograr una aproximación sobre la clasificación de la subunidad que aislamos.

Por otro lado, tocando el punto de las acciones de los antagonistas de receptores al GABA en vertebrados, es importante notar que la bicuculina (considerado como un antagonista competitivo) no mostró ningún efecto en las corrientes activadas por el GABA de los canales recombinantes o de los nativos. En neuronas de invertebrado se logró la identificación de un canal de cloruro activado por el c-ACA pero resistente a bicuculina, el cual en un principio fue considerado como un receptor con un perfil farmacológico similar al propuesto para los receptores GABA ρ (Jackel et al., 1994). Como mencione previamente, nosotros habíamos pensado incluir a la subunidad aislada como parte de una familia de receptores “tipo- ρ ”, debido a que era modulada por el c-ACA, carecía de acción por la bicuculina y porque no desensibilizaba (Johnston et al., 2010). Sin embargo, cuando se analizó el efecto del TPMPA en las neuronas del órgano-X, este no mostró ningún efecto en las corrientes evocadas, lo cual hizo que abandonáramos esa idea.

Pero volviendo al punto donde la bicuculina no tuvo efecto alguno en los receptores formados por pcGABA $\alpha\beta$, y considerando que el sitio de unión al GABA está

altamente conservado en la subunidad clonada, nosotros esperábamos que tal compuesto actuara como un antagonista. Cabe señalar que mutaciones en el sitio de unión al GABA pueden convertir a la bicuculina de un antagonista a un agonista débil o simplemente perder su efecto, lo cual sugiere que con pequeñas alteraciones en este sitio pueden afectar su acción (Johnston, 2013). También, el sitio de unión al GABA puede ser sutilmente diferente entre receptores al GABA homoméricos y heteroméricos, lo cual sin duda afectaría la sensibilidad a bicuculina. Por ejemplo, los receptores homoméricos GABA_A no pueden ser bloqueados por este antagonista (Sedelnikova et al., 2005). A todo esto, es posible que la estequiometría del receptor en invertebrados, la cual difiere de los vertebrados, sea la causante de la ausencia de efecto, porque al menos hasta la fecha no se han encontrado muchos ejemplos de canales bloqueados por bicuculina en invertebrados, a excepción de la subunidad aislada del molusco *Lymnaea stagnalis* que sí forma canales sensibles a este antagonista competitivo (Harvey et al., 1991).

Por otro lado, el receptor pcGABA_Aβ expresado en células HEK, a diferencia de lo que sucedió con bicuculina, sí resultó ser altamente sensible a la PTX. ¿Pero qué nos dice esto acerca de la composición del receptor? Hace varios años se reportó que un receptor al GABA homomérico formado por subunidades β1 era suficiente para formar sitios de unión a la PTX, con la diferencia de que este canal, sorprendentemente, era capaz de abrirse en ausencia del GABA (Sigel et al., 1989). Con estos estudios, es muy probable que el ADNc aislado pueda codificar para una subunidad “tipo-β”, porque para que un GABA_AR muestre sensibilidad a un antagonismo no competitivo se requiere la presencia de una subunidad β, la cual por sí sola es suficiente para formar los sitios de interacción con la PTX (Carpenter et al., 2013).

En conjunto, todos estos datos acerca de la naturaleza iónica de las respuestas al GABA en las neuronas del órgano-X, y tomando en cuenta que los LGICs tienen la habilidad para discriminar entre iones, la acción dual del GABA en esas neuronas (excitadora o inhibitoria) depende sin duda alguna de los determinantes moleculares

presentes en el poro de selectividad, lo cual nos lleva a la idea de que probablemente la estequiometría de este tipo de receptores (homoméricos o heteroméricos) pueda definir la naturaleza iónica de las corrientes observadas y que indudablemente sean dadas en función del papel que representan en esas neuronas. Como ya he mencionado, quizás la expresión diferencial de subunidades de los GABARs sea la razón del por qué existen diferentes acciones del GABA, además de restringirse meramente a patrones donde se requiere el transporte de señales específicas.

Un antagonista de receptores catiónicos altera la cinética de inactivación de las corrientes activadas por el GABA en los receptores nativos y recombinantes

Aunque este trabajo no se centró en abordar una evidencia farmacológica para la mecamilamina, con los resultados obtenidos que muestran efectos similares de este bloqueador de canales catiónicos en las corrientes activadas por el GABA, registradas tanto en las neuronas del órgano-X como en las células HEK, se apoya la idea de que la subunidad aislada es la responsable de formar receptores funcionales en esas neuronas, que a su vez median las respuestas al GABA dependientes de cloruro descritas previamente.

Se ha observado que este antagonista puede unirse a sitios localizados cercanos a los vestíbulos citoplasmáticos y extracelulares de los AChRs, y que además puede interactuar en diferentes orientaciones (Bondarenko et al., 2014). Esta divergencia de interacciones sugiere que los diferentes subtipos de AChRs pueden tener distintos sitios de unión para la mecamilamina y sus enantiómeros, regiones que distan mucho de los sitios ortoestéricos (Arias et al., 2010). El mecanismo que se ha sugerido para la acción de la mecamilamina, es que tras la activación de los receptores inducida por el agonista, el antagonista penetra y bloquea de una manera dependiente de voltaje a los receptores de ACh que se encuentran en estado abierto, poco después el canal se cierra, la molécula alcanza los sitios no luminales y finalmente queda atrapada en un ambiente menos iónico (Giniatullin et al., 2000).

Con lo anterior, y volviendo al punto en que un bloqueador de receptores catiónicos tuvo efecto en las corrientes que analizamos, podemos decir que: si bien la acción no fue del todo inhibidora, ya sea en los receptores nativos de las neuronas del órgano-X o en los expresados en células HEK, la mecamilamina tuvo un efecto marcado en la inactivación de la corriente, como si la cinética de inactivación se hiciera más lenta. Primero, en cuanto a las corrientes nativas, el efecto observado no resultaría del todo extraño debido a que, si el compuesto es un bloqueador de canales catiónicos, y que en las neuronas del acocil observamos una corriente que es dependiente de sodio, los receptores nativos con selectividad catiónica podrían incorporar un sitio de unión a este compuesto, tal como sucede en los receptores colinérgicos. Por otro lado, si analizamos el mismo efecto pero en este caso con el receptor aislado y expresado en las células HEK, resultaría más difícil de explicar el fenómeno de modulación por mecamilamina, porque entonces estaríamos considerando que el mismo sitio de unión a un bloqueador de receptores catiónicos también se encuentra en receptores con selectividad aniónica, lo cual eliminaría la idea de que este antagonista sea considerado como un bloqueador específico para canales con acción despolarizante.

De manera interesante, varios sitios de unión a mecamilamina encontrados en los AChRs (dominio transmembranal de la composición $\alpha 4\beta 2$) coinciden con los dominios de unión a anestésicos descritos en canales iónicos activados por protones ELIC, como los encontrados en la bacteria *E. chrysanthemi* (Spurny et al., 2013). Con base en los modelos propuestos para las distintas conformaciones que adoptan los AChRs durante los procesos de apertura y cierre, se ha llegado a la conclusión de que la rotación de los segmentos TM2 alrededor del eje de la hélice es importante en el *gating* del canal, y para que los residuos hidrofóbicos localizados a lo largo del canal iónico cerrado se oculten y den oportunidad de que residuos polares se expongan durante el estado abierto, lo cual es importante para la conducción del canal (Bartos et al., 2009; Jha et al., 2009). Considerando esos modelos para los AChRs, es posible que la mecamilamina se una a los GABARs (analizados en las neuronas del órgano-X y en las células HEK) en sitios no

luminales de manera parcial y, por tanto, impida la rotación de los segmentos TM2 al momento de la transición del canal a un estado cerrado, irrumpiendo el cambio de residuos polares a hidrofóbicos, manteniendo al receptor en una conformación semi-abierta prolongada y, por consiguiente, una cinética de inactivación más lenta.

pcGABA_Aβ como blanco importante para el control de *P. clarkii*

Tomando en cuenta el enorme potencial invasivo del acocil (Capinha and Anastácio, 2011), es probable que esta especie colonice muchos hábitat en el futuro. Dada la fuerte presión de selección impuesta por este predador (Cruz and Rebelo, 2005; Cruz et al., 2008; Nunes et al., 2010; Ficetola et al., 2011), algunas poblaciones o especies no son capaces de evolucionar tácticas defensivas lo suficientemente rápidas para dificultar la disminución de su población o incluso su extinción. En conjunto, hay varios estudios que sugieren que los predadores invasivos pueden manejar cambios evolutivos rápidos en las comunidades invadidas y consecuentemente las respuestas evolucionarias de las presas deben ser rápidas, pues resultan cruciales para sobrevivir al impacto del acocil (Nunes et al., 2014).

El estudio del comportamiento del acocil *P. clarkii* es de particular interés para ahondar la información referente a la disciplina de las invasiones biológicas, lo cual hace necesario un análisis de los diferentes niveles de patrones que median su comportamiento, resultando relevante para comprender el potencial de las especies invasivas y, por consiguiente, llevar al desarrollo de programas destinados al manejo y control de estas especies.

La posibilidad de determinar un alto número de transcritos de proteínas importantes en la función del acocil siempre conlleva a una serie de ideas cuyo objetivo central es eliminar la posibilidad de que siga siendo una especie invasiva. Nuestro estudio ha incrementado la cantidad de información genética disponible para *P. clarkii*, aunque la secuenciación de proteínas en otros tejidos seguramente sería significativa para obtener un panorama más amplio de la función de este organismo. Estos resultados sin duda pueden ser benéficos para el desarrollo de pesticidas más novedosos, eficientes y seguros, que utilicen como blanco farmacológico a la

subunidad aislada. Asimismo, puede ser usado para crear nuevos métodos que restrinjan la expresión de los receptores al GABA, como el ARN de interferencia, con la finalidad de encontrar soluciones para reducir su capacidad invasiva.

En resumen, la información obtenida de la secuencia del ADNc aislado podría ayudar a entender algunos de los mecanismos de regulación de los procesos fisiológicos correspondientes a $\text{pcGABA}_{\text{A}\beta}$ en el acocil. Por tanto, disminuir su migración resultaría benéfico porque: 1) se reducirían los daños en los cultivos; 2) la transmisión del hongo considerado como plaga en el acocil y otros agentes patógenos peligrosos verían una disminución significativa; y 3) se reduciría el desplazamiento de especies nativas (Diéguez-Uribeondo and Söderhäll, 1993; Cano and Jiménez, 2003; Rezinciuc et al., 2014).

REFERENCIAS

- Agboh, K. C., Webb, T. E., Evans, R. J. and Ennion, S. J.** (2004). Functional characterization of a P2X receptor from *Schistosoma mansoni*. *The Journal of biological chemistry* **279**, 41650-41657.
- Akk, G., Covey, D. F., Evers, A. S., Mennerick, S., Zorumski, C. F. and Steinbach, J. H.** (2010). Kinetic and structural determinants for GABA-A receptor potentiation by neuroactive steroids. *Curr Neuropharmacol* **8**, 18-25.
- Amin, J. and Weiss, D.** (1993). GABA_A receptor needs two homologous domains of beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* **366**, 565-569.
- Anastácio, P. M. and Marques, J. C.** (1996). Crayfish (*Procambarus clarkii*) effects on initial stages of rice growth in the Lower Mondego river valley, Portugal. *Freshwater Crayfish* **11**, 608-617.
- Andrew, R. D., Orchard, I., Saleuddin, A. S.** (1978). Structural re-evaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. *Cell Tissue Res* **190**, 43-48.
- Aquiloni, L., Giulianini, P. G., Mosco, A., Guarnaccia, C., Ferrero, E. and Gherardi, F.** (2012). Crustacean hyperglycemic hormone (cHH) as a modulator of aggression in crustacean decapods. *PLoS one* **7**, e50047.
- Arias, H. R., Feuerbach, D., Bhumireddy, P. and Ortells, M. O.** (2010). Inhibitory mechanisms and binding site location for serotonin selective reuptake inhibitors on nicotinic acetylcholine receptors. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 712-724.
- Ashby, J. A., McGonigle, I. V., Price, K. L., Cohen, N., Comitani, F., Dougherty, D. A., Molteni, C. and Lummis, S. C.** (2012). GABA binding to an insect GABA receptor: a molecular dynamics and mutagenesis study. *Biophysical journal* **103**, 2071-2081.
- Balasubramanian, S., Teissere, J. A., Raju, D. V. and Hall, R. A.** (2004). Hetero-oligomerization between GABA_A and GABA_B receptors regulates GABA_B receptor trafficking. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18840-18850.
- Bamber, B. A., Twyman, R. E. and Jorgensen, E. M.** (2003). Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in *C. elegans*. *Br J Pharmacol* **138**, 883-893.
- Bamber, B. A., Beg, A. A., Twyman, R. E. and Jorgensen, E. M.** (1999). The *Caenorhabditis elegans* unc-49 locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 5348-5359.
- Barral, J., Toro, S., Galarraga, E. and Bargas, J.** (2000). GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels. *Neurosci Lett* **283**, 33-36.
- Bartos, M., Corradi, J. and Bouzat, C.** (2009). Structural basis of activation of cys-loop receptors: the extracellular-transmembrane interface as a coupling region. *Molecular neurobiology* **40**, 236-252.
- Baur, R., Kaur, K. H. and Sigel, E.** (2009). Structure of alpha6 beta3 delta GABA(A) receptors and their lack of ethanol sensitivity. *J Neurochem* **111**, 1172-1181.
- Beg, A. and Jorgensen, E.** (2003). EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nature Neuroscience* **6**, 1145-1152.
- Ben-Ari, Y.** (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**, 728-739.
- Ben-Ari, Y., Rovira, C., Gaiarsa, J. L., Corradetti, R., Robain, O. and Cherubini, E.** (1990). GABAergic mechanisms in the CA3 hippocampal region during early postnatal life. *Prog Brain Res* **83**, 313-321.
- Bettler, B. and Tiao, J. Y.** (2006). Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABA_B receptors. *Pharmacol Ther* **110**, 533-543.

- Bjurstom, H., Wang, J., Ericsson, I., Bengtsson, M., Liu, Y., Kumar-Mendu, S., Issazadeh-Navikas, S. and Birnir, B.** (2008). GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes. *J Neuroimmunol* **205**, 44-50.
- Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J. P., Delarue, M. and Corringer, P. J.** (2009). X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* **457**, 111-114.
- Bollan, K. A., Baur, R., Hales, T. G., Sigel, E. and Connolly, C. N.** (2008). The promiscuous role of the epsilon subunit in GABAA receptor biogenesis. *Mol Cell Neurosci* **37**, 610-621.
- Bondarenko, V., Targowska-Duda, K. M., Jozwiak, K., Tang, P. and Arias, H. R.** (2014). Molecular interactions between mecamylamine enantiomers and the transmembrane domain of the human alpha4beta2 nicotinic receptor. *Biochemistry* **53**, 908-918.
- Bray, W. A. and Lawrence, A. L.** (1992). Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In *Marine Shrimp Culture: Principle and Practices*, eds. A. W. Fast and J. L. Lester, pp. 93-170. Netherlands: Elsevier.
- Bregestovski, P. and Bernard, C.** (2012). Excitatory GABA: How a Correct Observation May Turn Out to be an Experimental Artifact. *Frontiers in pharmacology* **3**, 65.
- Brejč, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B. and Sixma, T. K.** (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269-276.
- Browdy, C. L.** (1992). A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, (ed. J. Wyban), pp. 22-51. Florida, USA: World Aquaculture Society.
- Buckingham, S. and Sattelle, D.** (2004). GABA receptors of insects: Elsevier Pergamon, Amsterdam, The Netherlands.
- Buckingham, S., Hosie, A., Roush, R. and Sattelle, D.** (1994). Actions of agonists and convulsant antagonists on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (RDL) homo-oligomer expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* **181**, 137-140.
- Buckingham, S., Biggin, P., Sattelle, B., Brown, L. and Sattelle, D.** (2005). Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Molecular pharmacology* **68**, 942-951.
- Burnstock, G.** (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 166-176.
- Bussieres, N. and El Manira, A.** (1999). GABA(B) receptor activation inhibits N- and P/Q-type calcium channels in cultured lamprey sensory neurons. *Brain Res* **847**, 175-185.
- Calimet, N., Simoes, M., Changeux, J. P., Karplus, M., Taly, A. and Cecchini, M.** (2013). A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3987-3996.
- Cano, E. and Jiménez, A.** (2003). Effect of three pesticides on the intersexual mortality of *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda, Cambaridae). *Zool baetica* **13**, 145-153.
- Capinha, C. and Anastácio, P.** (2011). Assessing the environmental requirements of invaders using ensembles of distribution models. *Diversity and Distributions* **17**, 13-24.
- Capogna, M. and Pearce, R. A.** (2011). GABA A,slow: causes and consequences. *Trends Neurosci* **34**, 101-112.
- Carpenter, T., Lau, E. and Lightstone, F.** (2013). Identification of a possible secondary picrotoxin-binding site on the GABA_A receptor. *Chemical Research in Toxicology* **26**, 1444-1454.
- Casida, J. E.** (1993). Insecticide action at the GABA-gated chloride channel: recognition, progress, and prospects. *Arch Insect Biochem Physiol* **22**, 13-23.

- Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M. and Miles, R.** (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**, 1418-1421.
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J. and Spedding, M.** (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**, 2-5.
- Connolly, C. N. and Wafford, K. A.** (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* **32**, 529-534.
- Correia, A. M.** (1993). Situation de l'acclimatation de l'écrevisse rouge des marais, *Procambarus clarkii*, au Portugal. *L'Astaciculture de France* **35**, 2-9.
- Correia, A. M.** (2001). Seasonal and interspecific evaluation of predation by mammals and birds on the introduced red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Crustacea, Cambaridae) in a freshwater marsh (Portugal). *Journal of Zoology* **55**, 533-541.
- Corringer, P. J., Le Novere, N. and Changeux, J. P.** (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 431-458.
- Couve, A., Thomas, P., Calver, A. R., Hirst, W. D., Pangalos, M. N., Walsh, F. S., Smart, T. G. and Moss, S. J.** (2002). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nat Neurosci* **5**, 415-424.
- Cruz, M. J. and Rebelo, R.** (2005). Vulnerability of southwest Iberian amphibians to an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*. *Amphibia-Reptilia* **26**, 293-303.
- Cruz, M. J., Segurado, P., Sousa, M. and Rebelo, R.** (2008). Collapse of the amphibian community of the Paul do Boquilobo Natural Reserve (central Portugal) after the arrival of the exotic American crayfish *Procambarus clarkii*. *Herpetological Journal* **18**, 197-204.
- Chang, Y., Wang, R., Barot, S. and Weiss, D. S.** (1996). Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 5415-5424.
- Changeux, J.-P. and Edelstein, S. J.** (2005). Nicotinic acetylcholine receptors : from molecular biology to cognition. New York: Odile Jacob.
- Chen, G. and van den Pol, A. N.** (1998). Presynaptic GABAB autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 1913-1922.
- Chen, R., Belelli, D., Lambert, J., Peters, J., Reyes, A. and Lan, N.** (1994). Cloning and functional expression of a Drosophila γ -aminobutyric acid receptor. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 6069 -6073.
- Chen, Z. W. and Olsen, R. W.** (2007). GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J Neurochem* **100**, 279-294.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L. and Ben-Ari, Y.** (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* **14**, 515-519.
- Darlison, M. G., Pahal, I. and Thode, C.** (2005). Consequences of the evolution of the GABA(A) receptor gene family. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 607-624.
- Delpire, E.** (2000). Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* **15**, 309-312.
- Dickinson, P. S. and Marder, E.** (1989). Peptidergic modulation of a multioscillator system in the lobster. I. Activation of the cardiac sac motor pattern by the neuropeptides proctolin and red pigment-concentrating hormone. *Journal of neurophysiology* **61**, 833-844.
- Dickinson, P. S., Hauptman, J., Hetling, J. and Mahadevan, A.** (2001). RCPH modulation of a multi-oscillator network: effects on the pyloric network of the spiny lobster. *Journal of neurophysiology* **85**, 1424-1435.

- Dibas, M., Gonzales, E., Dillon, G., Das, P., Bell-Horner, C. and Dillon, G.** (2002). Second Transmembrane Domain That Identification of a Novel Residue within the confers Use-facilitated Block by Picrotoxin in Glycine α 1 receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**, 9112-9117.
- Diéguez-Urbeondo, J. and Söderhäll, K.** (1993). Procambarus clarkii Girard as a vector for the crayfish plague fungus, Aphanomyces astaci Schikora. *Aquaculture Research* **24**, 761-765.
- Douglass, J. K., Wilkens, L., Pantazelou, E. and Moss, F.** (1993). Noise enhancement of information transfer in crayfish mechanoreceptors by stochastic resonance. *Nature* **365**, 337-340.
- Du, H. H., Hou, C. L., Wu, X. G., Xie, R. H. and Wang, Y. Z.** (2013). Antigenic and immunogenic properties of truncated VP28 protein of white spot syndrome virus in Procambarus clarkii. *Fish & shellfish immunology* **34**, 332-338.
- Eccles, J. C., Schmidt, R. and Willis, W. D.** (1963). Pharmacological Studies on Presynaptic Inhibition. *J Physiol* **168**, 500-530.
- Enna, S. J. and Mohler, H.** (2007). The GABA Receptors. New Delhi, Delhi, India: Humana Press.
- Fedorenko, G. M. and Uzdensky, A. B.** (2008). Dynamics of ultrastructural changes in the isolated crayfish mechanoreceptor neuron under photodynamic impact. *Journal of neuroscience research* **86**, 1409-1416.
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fernandez-Alacid, L., Aguado, C., Ciruela, F., Martin, R., Colon, J., Cabanero, M. J., Gassmann, M., Watanabe, M., Shigemoto, R., Wickman, K. et al.** (2009). Subcellular compartment-specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABA-activated GIRK channels in Purkinje cells. *J Neurochem* **110**, 1363-1376.
- Ffrench-Constant, R. H.** (1993). Cloning of a putative GABAA receptor from cyclodiene-resistant Drosophila: a case study in the use of insecticide-resistant mutants to isolate neuroreceptors. *EXS* **63**, 210-223.
- Ffrench-Constant, R. H., Rocheleau, T. A., Steichen, J. C. and Chalmers, A. E.** (1993). A point mutation in a Drosophila GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* **363**, 449-451.
- Ffrench-Constant, R. H., Mortlock, D. P., Shaffer, C. D., MacIntyre, R. J. and Roush, R. T.** (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in Drosophila: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7209-7213.
- Ficetola, F. G., Siesa, M. E., Manenti, R., Bottoni, L., De Bernardi, F. and Padoa-Schioppa, E.** (2011). Early assessment of the impact of alien species: differential consequences of an invasive crayfish on adult and larval amphibians. *Diversity and Distributions* **17**, 1141-1151
- Fingerman, M.** (1985). The Physiology and Pharmacology of Crustacean Chromatophores. *American Zoologist* **25**, 233-252.
- Fountain, S. J., Parkinson, K., Young, M. T., Cao, L., Thompson, C. R. and North, R. A.** (2007). An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in Dictyostelium discoideum. *Nature* **448**, 200-203.
- Gallagher, J. P., Higashi, H. and Nishi, S.** (1978). Characterization and ionic basis of GABA-induced depolarizations recorded in vitro from cat primary afferent neurones. *J Physiol* **275**, 263-282.
- Gamradt, S. C. and Kats, L. B.** (1996). Effects of introduced crayfish and mosquitofish on California newts. *Conservation Biology* **10**, 1155-1162.
- García, U., García-Colunga, J. and Aréchiga, H.** (1991). Differential effects of gamma-aminobutyric acid, glycine and taurine on central synapses of crustaceans. *Proc West Pharmacol Soc* **34**, 215-218.
- García, U., Grumbacher-reinert, S., Bookman, R. and Reuter, H.** (1989). Distribution of Na⁺ and K⁺ Currents in Soma, Axons and Growth Cones of Leech Retzius Neurones in Culture. *The Journal of experimental biology* **150**, 1-17.

- García, U., Onetti, C., Valdiosera, R. and Arechiga, H.** (1994). Excitatory action of γ -Aminobutyric Acid (GABA) on crustacean neurosecretory cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* **14**, 71-88.
- Giniatullin, R. A., Sokolova, E. M., Di Angelantonio, S., Skorinkin, A., Talantova, M. V. and Nistri, A.** (2000). Rapid relief of block by mecamylamine of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells in vitro: an electrophysiological and modeling study. *Molecular pharmacology* **58**, 778-787.
- Gisselmann, G., Plonka, J., Pusch, H. and Hatt, H.** (2004). Drosophila melanogaster GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *British Journal of Pharmacology* **142**, 409-413.
- Goaillard, J. and Marder, E.** (2003). Exciting guts with GABA. *Nature Neuroscience* **6**, 1121-1122.
- Goldmakher, G. V. and Moss, R. L.** (2000). A subset of periglomerular neurons in the rat accessory olfactory bulb may be excited by GABA through a Na(+)-dependent mechanism. *Brain Res* **871**, 7-15.
- Gulledge, A. T. and Stuart, G. J.** (2003). Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* **37**, 299-309.
- Gutierrez-Yurrita, P. J., Sancho, G., Bravo, M. A., Baltanas, A. and Montes, C.** (1998). Diet of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in natural ecosystems of the Donana National Park temporary fresh-water marsh (Spain). *Journal of Crustacean Biology* **18**, 120-127.
- Gutiérrez-Yurrita, P. J., Martínez, J. M., Ilhéu, M., Bravo-Utrera, M. A., Bernardo, J. M. and Montes, C.** (1999). The status of crayfish populations in Spain and Portugal. In *The biodiversity crisis and crustacea*, vol. 11 eds. F. Gherardi and D. M. Holdich), pp. 161-192. Rotterdam, Netherlands: Balkema, A. A.
- Hackam, A. S., Wang, T. L., Guggino, W. B. and Cutting, G. R.** (1997). The N-terminal domain of human GABA receptor rho1 subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction. *The Journal of biological chemistry* **272**, 13750-13757.
- Harrison, N. J. and Lummis, S. C.** (2006). Locating the carboxylate group of GABA in the homomeric rho GABA(A) receptor ligand-binding pocket. *The Journal of biological chemistry* **281**, 24455-24461.
- Harvey, R. J., Vreugdenhil, E., Zaman, S. H., Bhandal, N. S., Usherwood, P. N., Barnard, E. A. and Darlison, M. G.** (1991). Sequence of a functional invertebrate GABA_A receptor subunit which can form a chimeric receptor with a vertebrate alpha subunit. *The EMBO journal* **10**, 3239-3245.
- Higuchi, R., Krummell, B. and Saiki, R.** (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* **6**, 7351-7367.
- Hilf, R. J. and Dutzler, R.** (2009). Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **457**, 115-118.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. and Pease, L. R.** (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hobbs, H. H., Jass, J. P. and Huner, J. V.** (1989). A review of global introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* **56**, 299-316.
- Hogg, R. C., Buisson, B. and Bertrand, D.** (2005). Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochem Pharmacol* **70**, 1267-1276.
- Holdich, D. M.** (1999). The negative effects of established crayfish populations. In *The biodiversity crisis and crustacea*, vol. 11 eds. F. In Gherardi and D. M. Holdich), pp. 31-48. Rotterdam, Netherlands: Balkema, A. A.
- Holdich, D. M.** (2002). Background and functional morphology. In *Biology of freshwater crayfish*, (ed. D. M. Holdich), pp. 1-27. Oxford, UK: Blackwell Science.

- Holdich, D. M., Gydemo, R. and D., R. W.** (1999). A review of possible methods for controlling nuisance populations of alien crayfish. In *The biodiversity crisis and crustacea*, vol. 11 eds. F. Gherardi and D. M. Holdich), pp. 245-270. Rotterdam, Netherlands: Balkema, A. A. .
- Hollins, B. and McClintock, T.** (2000). Lobster GABA Receptor Subunit Expressed in Neural Tissues. *Journal of neuroscience research* **59**, 534-541.
- Hopkins, P. M.** (2012). The eyes have it: A brief history of crustacean neuroendocrinology. *General and comparative endocrinology* **175**, 357-366.
- Hosie, A., Aronstein, K., Sattelle, D. and ffrench-Constant, R.** (1997). Molecular biology of insect neuronal el GABA receptors. *Trends Neurosci* **20**, 578-583.
- Hosie, A. M. and Sattelle, D. B.** (1996). Agonist pharmacology of two Drosophila GABA receptor splice variants. *Br J Pharmacol* **119**, 1577-1585.
- Hosie, A. M., Buckingham, S. D., Presnail, J. K. and Sattelle, D. B.** (2001). Alternative splicing of a Drosophila GABA receptor subunit gene identifies determinants of agonist potency. *Neuroscience* **102**, 709-714.
- Huson, D. H., Richter, D. C., Rausch, C., DeZulian, T., Franz, M. and Rupp, R.** (2007). Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* **8**, 460.
- Ishaaya, I. and Horowitz, A. R.** (2009). Biorational control of arthropod pests : application and resistance management. Dordrecht ; New York: Springer.
- Jackel, C., Krenz, W. and Nagy, F.** (1994). A receptor with GABA_C-like pharmacology in invertebrate neurones in culture. *NeuroReport* **5**, 1097-1101.
- Jacob, T. C., Moss, S. J. and Jurd, R.** (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* **9**, 331-343.
- Janssen, D., Derst, C., Rigo, J. and Van Kerkhove, E.** (2010). Cys-loop ligand-gated chloride channels in dorsal unpaired median neurons of *Locusta migratoria*. *J Neurophysiol* **103**, 2587-2598.
- Jarvis, M. F. and Khakh, B. S.** (2009). ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* **56**, 208-215.
- Jensen, M. L., Timmermann, D. B., Johansen, T. H., Schousboe, A., Varming, T. and Ahring, P. K.** (2002). The beta subunit determines the ion selectivity of the GABA_A receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**, 41438-41447.
- Jha, A., Purohit, P. and Auerbach, A.** (2009). Energy and structure of the M2 helix in acetylcholine receptor-channel gating. *Biophysical journal* **96**, 4075-4084.
- Johnson, B. M., Arlinghaus, R. and Martinez, P. J.** (2009). Are we doing all we can to stem the tide of illegal fish stocking? . *Fisheries* **34**, 380-394.
- Johnston, G.** (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *British Journal of Pharmacology* **169**, 328-336.
- Johnston, G., Chebib, M., Hanrahan, J. and Mewett, K.** (2010). Neurochemicals for the Investigation of GABA_C receptors. *Neurochem Res* **35**, 1970-1977.
- Johnston, G. A.** (1996). GABA_C receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci* **17**, 319-323.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. and Thornton, J. M.** (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences: CABIOS* **8**, 275-282.
- Jones, M. V., Sahara, Y., Dzubay, J. A. and Westbrook, G. L.** (1998). Defining affinity with the GABA_A receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 8590-8604.
- Kaila, K., Pasternack, M., Saarikoski, J. and Voipio, J.** (1989). Influence of GABA-gated bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres. *J Physiol* **416**, 161-181.

- Kaila, K., Lamsa, K., Smirnov, S., Taira, T. and Voipio, J.** (1997). Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 7662-7672.
- Karlin, A. and Akabas, M. H.** (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* **15**, 1231-1244.
- Katz, B.** (1966). Nerve, muscle, and synapse. New York,: McGraw-Hill.
- Kaur, K. H., Baur, R. and Sigel, E.** (2009). Unanticipated structural and functional properties of delta-subunit-containing GABAA receptors. *The Journal of biological chemistry* **284**, 7889-7896.
- Kehoe, J. and Vulfius, C.** (2000). Independence of and interactions between GABA-, glutamate-, and acetylcholine-activated Cl conductances in Aplysia neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 8585-8596.
- Keramidas, A., Moorhouse, A. J., Schofield, P. R. and Barry, P. H.** (2004). Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol* **86**, 161-204.
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., Voigt, M. and Humphrey, P. P.** (2001). International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* **53**, 107-118.
- Kneussel, M. and Betz, H.** (2000). Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol* **525 Pt 1**, 1-9.
- Krusek, J., Dittert, I., Hendrych, T., Hnik, P., Horak, M., Petrovic, M., Sedlacek, M., Susankova, K., Svobodova, L., Touseva, K. et al.** (2004). Activation and modulation of ligand-gated ion channels. *Physiol Res* **53 Suppl 1**, S103-113.
- Kucenas, S., Li, Z., Cox, J. A., Egan, T. M. and Voigt, M. M.** (2003). Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience* **121**, 935-945.
- Ladera, C., del Carmen Godino, M., Jose Cabanero, M., Torres, M., Watanabe, M., Lujan, R. and Sanchez-Prieto, J.** (2008). Pre-synaptic GABA receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *J Neurochem* **107**, 1506-1517.
- Land, M. F.** (2000). Eyes with mirror optics. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* **2**, 44-50.
- Lape, R., Colquhoun, D. and Sivilotti, L. G.** (2008). On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature* **454**, 722-727.
- Larson, E. R. and Olden, J. D.** (2008). Do schools and golf courses represent emerging pathways for crayfish invasions? . *Aquatic Invasions* **3**, 465-468.
- Le Novere, N. and Changeux, J. P.** (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* **40**, 155-172.
- Lemoine, D., Jiang, R., Taly, A., Chataigneau, T., Specht, A. and Grutter, T.** (2012). Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition. *Chem Rev* **112**, 6285-6318.
- Li, Y., Guo, X., Cao, X., Deng, W., Luo, W. and Wang, W.** (2012). Population genetic structure and post-establishment dispersal patterns of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in China. *PLoS one* **7**, e40652.
- Lingle, C. and Marder, E.** (1981). A glutamate-activated chloride conductance on a crustacean muscle. *Brain Res* **212**, 481-488.
- Liu, G., Zhou, L., Li, X. and Lu, D.** (2013). Population genetic structure of the invasive red swamp crayfish in China revealed by ITS1 variation. *Biochemical genetics* **51**, 841-852.

- Liu, X., Buchanan, M. E., Han, K. A. and Davis, R. L.** (2009). The GABAA receptor RDL suppresses the conditioned stimulus pathway for olfactory learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 1573-1579.
- Lodge, D. and Dingledine, R.** (2000). The IUPHAR Receptor Compendium. In *Ionotropic glutamate receptors*, (ed. I. Media), pp. 189-194.
- Lok, C. K., Kiat, N. S. and Koh, T. K.** (1977). An autocidal ovitrap for the control and possible eradication of *Aedes aegypti*. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* **8**, 56-62.
- Lujan, R., Shigemoto, R. and Lopez-Bendito, G.** (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* **130**, 567-580.
- Lummis, S. C.** (2009). Locating GABA in GABA receptor binding sites. *Biochem Soc Trans* **37**, 1343-1346.
- Lummis, S. C., McGonigle, I., Ashby, J. A. and Dougherty, D. A.** (2011). Two amino acid residues contribute to a cation- π binding interaction in the binding site of an insect GABA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 12371-12376.
- Lummis, S. C., D, L. B., Harrison, N. J., Lester, H. A. and Dougherty, D. A.** (2005). A cation- π binding interaction with a tyrosine in the binding site of the GABAC receptor. *Chem Biol* **12**, 993-997.
- Manfrin, C., Tom, M., De Moro, G., Gerdol, M., Giulianini, P. G. and Pallavicini, A.** (2015). The eyestalk transcriptome of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene* **557**, 28-34.
- Marder, E. and Paupardin-Tritsch, D.** (1978). The pharmacological properties of some crustacean neuronal acetylcholine, gamma-aminobutyric acid and L-glutamate responses. *J. Physiol* **280**, 213-236.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G. and Wu, C.** (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**, 793-807.
- Martelloni, G., Bagnoli, F. and Libelli, S. M.** (2012). A dynamical population modeling of invasive species with reference to the crayfish *Procambarus clarkii*. *Theoretical biology forum* **105**, 47-69.
- Martin, R.** (1993). Neuromuscular transmission in nematode parasites and antinematodal drug action. *Pharmacol Ther* **58**, 13-50.
- Martin, S. C., Steiger, J. L., Gravielle, M. C., Lyons, H. R., Russek, S. J. and Farb, D. H.** (2004). Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons. *J Comp Neurol* **473**, 16-29.
- Matsuzaki, S. S., usio, N., Takamura, N. and Washitani, I.** (2009). Contrasting impacts of invasive engineers on freshwater ecosystems: an experiment and meta-analysis. *Oecologia* **158**, 673-685.
- McGonigle, I. and Lummis, S. C.** (2009). RDL receptors. *Biochem Soc Trans* **37**, 1404-1406.
- McGonigle, I. and Lummis, S. C.** (2010). Molecular characterization of agonists that bind to an insect GABA receptor. *Biochemistry* **49**, 2897-2902.
- Mercado, J. and Czajkowski, C.** (2006). Charged residues in the alpha1 and beta2 pre-M1 regions involved in GABA_A receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 2031-2040.
- Miller, P. and Aricescu, A.** (2014). Crystal structure of a human GABA_A receptor. *Nature*.
- Milligan, C. J., Buckley, N. J., Garret, M., Deuchars, J. and Deuchars, S. A.** (2004). Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAC receptor subunits in native central neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 7241-7250.
- Minier, F. and Sigel, E.** (2004). Positioning of the alpha-subunit isoforms confers a functional signature to gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7769-7774.

- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. and Unwin, N.** (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M. and Unwin, N.** (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* **288**, 765-786.
- Mizuta, K., Xu, D., Pan, Y., Comas, G., Sonett, J. R., Zhang, Y., Panettieri, R. A., Jr., Yang, J. and Emala, C. W., Sr.** (2008). GABAA receptors are expressed and facilitate relaxation in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L1206-1216.
- Mohler, H., Fritschy, J. and Rudolph, U.** (2002). A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 2-8.
- Momot, W. T.** (1991). Potential for exploitation of freshwater crayfish in coolwater systems: management guidelines and issues. *Fisheries* **16**, 14-20.
- Moorhouse, A., Keramidis, A., Zaykin, A., Schofield, P. and Barry, P.** (2002). Single channel analysis of conductance and rectification in cation-selective, mutant glycine receptor channels. *J. Gen. Physiol* **119**, 411-425.
- Narusuye, K., Nakao, T., Abe, R., Nagatomi, Y., Hirase, K. and Ozoe, Y.** (2007). Molecular cloning of a GABA receptor subunit from *Laodelphax striatella* (Fallen) and patch clamp analysis of the homooligomeric receptors expressed in a *Drosophila* cell line. *Insect Mol Biol* **16**, 723-733.
- Naur, P., Hansen, K. B., Kristensen, A. S., Dravid, S. M., Pickering, D. S., Olsen, L., Vestergaard, B., Egebjerg, J., Gajhede, M., Traynelis, S. F. et al.** (2007). Ionotropic glutamate-like receptor delta2 binds D-serine and glycine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14116-14121.
- Newell, J. G. and Czajkowski, C.** (2003). The GABAA receptor alpha 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating. *The Journal of biological chemistry* **278**, 13166-13172.
- Norekian, T. P.** (1999). GABAergic excitatory synapses and electrical coupling sustain prolonged discharges in the prey capture neural network of *Clione limacina*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 1863-1875.
- North, R. A.** (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**, 1013-1067.
- Nunes, A. L., Orizaola, G., Laurila, A. and Rebelo, R.** (2014). Rapid evolution of constitutive and inducible defenses against an invasive predator. *Ecology* **95**, 1520-1530.
- Nunes, A. L., Cruz, M. J., Tejedo, M., Laurila, A. and Rebelo, R.** (2010). Nonlethal injury caused by an invasive alien predator and its consequences for an anuran tadpole. *Basic and Applied Ecology* **11**, 645-654.
- Obata, K., Oide, M. and Tanaka, H.** (1978). Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture. *Brain Res* **144**, 179-184.
- Olsen, R. and Sieghart, W.** (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid_A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. *Pharmacol Rev* **60**, 243-260.
- Olsen, R. W. and Sieghart, W.** (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**, 141-148.
- Ortells, M. O. and Lunt, G. G.** (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* **18**, 121-127.
- Owens, D. F. and Kriegstein, A. R.** (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**, 715-727.
- Padgett, C. L., Hanek, A. P., Lester, H. A., Dougherty, D. A. and Lummis, S. C.** (2007). Unnatural amino acid mutagenesis of the GABA(A) receptor binding site residues reveals a novel cation-pi interaction between GABA and beta 2Tyr97. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 886-892.

- Papke, R. L., Sanberg, P. R. and Shytle, R. D.** (2001). Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 646-656.
- Perkins, K. and Wong, R.** (1996). Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol* **76**, 3886–3894.
- Perkins, K. L.** (1999). Cl⁻ accumulation does not account for the depolarizing phase of the synaptic GABA response in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol* **82**, 768-777.
- Pinard, A., Seddik, R. and Bettler, B.** (2010). GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol* **58**, 231-255.
- Plotkin, M. D., Snyder, E. Y., Hebert, S. C. and Delpire, E.** (1997). Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* **33**, 781-795.
- Popova, E.** (2014). Ionotropic GABA Receptors and Distal Retinal ON and OFF Responses. *Scientifica (Cairo)* **2014**, 149187.
- Purohit, P., Mitra, A. and Auerbach, A.** (2007). A stepwise mechanism for acetylcholine receptor channel gating. *Nature* **446**, 930-933.
- Qian, H., Pan, Y., Zhu, Y. and Khalili, P.** (2005). Picrotoxin Accelerates Relaxation of GABA_C Receptors. *Molecular pharmacology* **67**, 470-479.
- Qu, Z., Apel, E. D., Doherty, C. A., Hoffman, P. W. and Haganir, R. L.** (1996). The Synapse-Associated Protein Rapsyn Regulates Tyrosine Phosphorylation of Proteins Colocalized at Nicotinic Acetylcholine Receptor Clusters. *Mol Cell Neurosci* **8**, 171-184.
- Rauh, J. J., Lummis, S. C. and Sattelle, D. B.** (1990). Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 325-329.
- Reed, S., Staley, E., Mayginnis, J., Pintel, D. and Tullis, G.** (2006). Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods* **138**, 85-98.
- Ren, X. and Mody, I.** (2003). Gamma-hydroxybutyrate reduces mitogen-activated protein kinase phosphorylation via GABA B receptor activation in mouse frontal cortex and hippocampus. *The Journal of biological chemistry* **278**, 42006-42011.
- Rezinciuc, S., Galindo, J., Montserrat, J. and Diéguez-Urbeondo, J.** (2014). AFLP-PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *Fungal Biol* **118**, 612-620.
- Richmond, J. E. and Jorgensen, E. M.** (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* **2**, 791-797.
- Rose, T., Henikoff, J. and Henikoff, S.** (2003). CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research* **31**, 3763-3766.
- Sakaba, T. and Neher, E.** (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* **424**, 775-778.
- Sakmann, B. and Neher, E.** (1983). Single-channel recording. New York: Plenum Press.
- Sambrook, J. and Russell, D.** (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. New York.
- Sattelle, D. B., Harrison, J. B., Chen, H. H., Bai, D. and Takeda, M.** (2000). Immunocytochemical localization of putative gamma-aminobutyric acid receptor subunits in the head ganglia of *Periplaneta americana* using an anti-RDL C-terminal antibody. *Neurosci Lett* **289**, 197-200.
- Scanziani, M.** (2000). GABA spillover activates postsynaptic GABA(B) receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron* **25**, 673-681.
- Schaefer, B. C.** (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem* **227**, 255-273.

- Sedelnikova, A., Smith, C., Zakharkin, S., Davis, D., Weiss, D. and Chang, Y.** (2005). Mapping the $\rho 1$ GABA_C Receptor Agonist Binding Pocket. *The Journal of biological chemistry* **280**, 1535–1542.
- Schoettker, P. J. and Gist, D. H.** (1990). In Vitro Ecdysteroid Production by Y-Organs of the Blue Crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Crustacean Biology* **10**, 487-491.
- Sedlmeier, D.** (1988). The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regulatory peptides* **20**, 91-98.
- Shen, H., Braband, A. and Scholtz, G.** (2013). Mitogenomic analysis of decapod crustacean phylogeny corroborates traditional views on their relationships. *Molecular phylogenetics and evolution* **66**, 776-789.
- Siddiqui, S., Brown, D., Accardi, M. and Forrester, S.** (2012). Hco-LGC-38 is novel nematode cys-loop GABA receptor subunit. *Mol Biochem Parasitol* **185**, 137-144.
- Siddiqui, S. Z., Brown, D. D., Rao, V. T. and Forrester, S. G.** (2010). An UNC-49 GABA receptor subunit from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* is associated with enhanced GABA sensitivity in nematode heteromeric channels. *J Neurochem* **113**, 1113-1122.
- Sieghart, W.** (1995). Structure and pharmacology of GABA_A receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**, 181-234.
- Sieghart, W. and Sperk, G.** (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* **2**, 795-816.
- Sigel, E. and Steinmann, M.** (2012). Structure, function, and modulation of GABA_A receptors. *The Journal of biological chemistry* **287**, 40224-40231.
- Sigel, E., Baur, R., Malherbe, P. and Miihler, H.** (1989). The rat B1-subunit of the GABA_A receptor forms a picrotoxin-sensitive anion channel open in the absence of GABA. *FEBS Letters* **257**, 337-379.
- Sinkkonen, S. T., Hanna, M. C., Kirkness, E. F. and Korpi, E. R.** (2000). GABA(A) receptor epsilon and theta subunits display unusual structural variation between species and are enriched in the rat locus ceruleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 3588-3595.
- Skurdal, J. and Taugbol, T.** (2002). Crayfish of commercial importance. In *Biology of Freshwater Crayfish*, (ed. D. M. Holdich), pp. 467-510. Oxford, UK: Blackwell Science.
- Spurny, R., Billen, B., Howard, R. J., Brams, M., Debaveye, S., Price, K. L., Weston, D. A., Strelkov, S. V., Tytgat, J., Bertrand, S. et al.** (2013). Multisite binding of a general anesthetic to the prokaryotic pentameric *Erwinia chrysanthemi* ligand-gated ion channel (ELIC). *The Journal of biological chemistry* **288**, 8355-8364.
- Stein, V. and Nicoll, R. A.** (2003). GABA generates excitement. *Neuron* **37**, 375-378.
- Steinbach, J. H. and Akk, G.** (2001). Modulation of GABA(A) receptor channel gating by pentobarbital. *J Physiol* **537**, 715-733.
- Steinbach, J. H. and Akk, G.** (2011). Use of concatemers of ligand-gated ion channel subunits to study mechanisms of steroid potentiation. *Anesthesiology* **115**, 1328-1337.
- Stone, J. V., Mordue, W., Batley, K. E. and Morris, H. R.** (1976). Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* **263**, 207-211.
- Suarez-Serrano, A., Alcaraz, C., Ibanez, C., Trobajo, R. and Barata, C.** (2010). *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicology and environmental safety* **73**, 280-286.
- Sung, K. W., Kirby, M., McDonald, M. P., Lovinger, D. M. and Delpire, E.** (2000). Abnormal GABA_A receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 7531-7538.

- Surprenant, A. and North, R. A.** (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* **71**, 333-359.
- Swensen, A. M., Golowasch, J., Christie, A. E., Coleman, M. J., Nusbaum, M. P. and Marder, E.** (2000). GABA and responses to GABA in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *The Journal of experimental biology* **203**, 2075-2092.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S.** (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725-2729.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interfaz: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Thorn, P. and Petersen, O.** (1992). Activation of nonselective cation channels by physiological cholecystokinin concentrations in mouse pancreatic acinar cells. *J Gen Physiol* **100**, 11-25.
- Tretter, V., Ehya, N., Fuchs, K. and Sieghart, W.** (1997). Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 2728-2737.
- Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, Z., Weiss, D. and Steinbach, J.** (1997). Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABA_A receptor. *The Journal of Neuroscience* **17**, 625-634.
- Unwin, N.** (2000). The Croonian Lecture 2000. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of fast synaptic transmission. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 1813-1829.
- van der Velde, G., Rajagopal, S. and Kelleher, B.** (2000). Ecological impact of crustacean invaders: General considerations and examples from the Rhine River In *The Biodiversity Crisis and Crustacea*, vol. 12 eds. I. Muskó and A. bij de Vaate), pp. 3-34. Amsterdam, Netherlands: A. A. Balkema.
- Vassilatis, D. K., Elliston, K. O., Pares, P. S., Hamelin, M., Arena, J. P., Schaeffer, J. M., Van der Ploeg, L. H. and Cully, D. F.** (1997). Evolutionary relationship of the ligand-gated ion channels and the avermectin-sensitive, glutamate-gated chloride channels. *J Mol Evol* **44**, 501-508.
- Vogt, G.** (2008). How to minimize formation and growth of tumours: potential benefits of decapod crustaceans for cancer research. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **123**, 2727-2734.
- Wagner, D. A. and Czajkowski, C.** (2001). Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 67-74.
- Wagner, D. A., Czajkowski, C. and Jones, M. V.** (2004). An arginine involved in GABA binding and unbinding but not gating of the GABA(A) receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 2733-2741.
- Webster, S. G., Keller, R. and Dirksen, H.** (2012). The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and comparative endocrinology* **175**, 217-233.
- Witte, I., Kreienkamp, H., Gewecke, M. and Roeder, T.** (2002). Putative histamine-gated chloride channel subunits of the insect visual system and thoracic ganglion. *J. Neurochem* **83**, 504-514.
- Woodward, R. M., Polenzani, L. and Miledi, R.** (1993). Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acidA and gamma-aminobutyric acidB receptor agonists and antagonists. *Molecular pharmacology* **43**, 609-625.
- Wotring, V. E., Miller, T. S. and Weiss, D. S.** (2003). Mutations at the GABA receptor selectivity filter: a possible role for effective charges. *J Physiol* **548**, 527-540.

- Wu, C. and Nebert, D. W.** (2004). Update on genome completion and annotations: Protein Information Resource. *Hum Genomics* **1**, 229-233.
- Wu, C. and Sun, D.** (2014). GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metab Brain Dis.*
- Xu, G., Broadbelt, K. G., Haynes, R. L., Folkerth, R. D., Borenstein, N. S., Belliveau, R. A., Trachtenberg, F. L., Volpe, J. J. and Kinney, H. C.** (2011). Late development of the GABAergic system in the human cerebral cortex and white matter. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**, 841-858.
- Yip, G. M., Chen, Z. W., Edge, C. J., Smith, E. H., Dickinson, R., Hohenester, E., Townsend, R. R., Fuchs, K., Sieghart, W., Evers, A. S. et al.** (2013). A propofol binding site on mammalian GABAA receptors identified by photolabeling. *Nat Chem Biol* **9**, 715-720.
- Yuzaki, M.** (2003). The delta2 glutamate receptor: 10 years later. *Neurosci Res* **46**, 11-22.
- Zhainazarov, A., Doolin, R., Hoegg, R. and Ache, B.** (1999). GABA-mediated inhibition of primary olfactory receptor neurons. *Biol Sig Recept* **8**.
- Zhainazarov, A., Wachowiak, M., Boettcher, A., Elenes, S. and Ache, B.** (1997). Ionotropic GABA receptor from lobster olfactory projection neurons. *J. Neurophysiol* **77**, 2235–2251.
- Zhang, H., Lee, H., Rocheleau, T., Ffrench-Constant, R. and Jackson, M.** (1995). Subunit composition determines picrotoxin and bicuculline sensitivity of Drosophila gamma-aminobutyric acid receptors. *Molecular pharmacology* **48**, 835-840.
- Zhang, J., Xue, F., Liu, Y., Yang, H. and Wang, X.** (2013). The structural mechanism of the Cys-loop receptor desensitization. *Molecular neurobiology* **48**, 97-108.
- Zhu, B. F., Huang, Y., Dai, Y. G., Bi, C. W. and Hu, C. Y.** (2013). Genetic diversity among red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) populations in the middle and lower reaches of the Yangtze River based on AFLP markers. *Genetics and molecular research : GMR* **12**, 791-800.
- Zuo, J., De Jager, P. L., Takahashi, K. A., Jiang, W., Linden, D. J. and Heintz, N.** (1997). Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* **388**, 769-773.