



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magister en Neurobiología

**CONTROL DE LA CONDUCTANCIA DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub> POR  
RESIDUOS INTRACELULARES: IMPLICANCIAS EN LA REGULACION  
DEL CANAL POR FOSFORILACION**

Tesis para optar al grado de Magister en Neurobiología

DAVID ESTEBAN FLAIG LOBOS  
CONCEPCIÓN – CHILE  
2023

Profesor Guía: Dr. Gustavo Moraga Cid  
Profesor Co-Guía: Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo  
Departamento de Fisiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

©2023. David Esteban Flaig Lobos.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes del comité evaluador:

Profesor Guía

---

Dr. Gustavo Moraga Cid  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

---

Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora

---

Dra María Pertusa Pastor  
Facultad de Química y Biología  
Universidad de Santiago de Chile

---

Dr. Patricio Castro Maldonado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Directora (S) de Programa

---

Katterine Salazar Martínez  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo contó con el apoyo de las siguientes becas:

- Beca ANID Magister Nacional, año 2021.
- Beca de Arancel, otorgada por la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción, años 2020, 2022.
- Beca de estipendio otorgada por la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción, año 2020.

Además, esta tesis contó con el financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto FONDECYT regular 1211095. Investigador Principal: Dr. Gustavo Moraga Cid.
- Proyecto FONDECYT regular 1211082. Investigador Principal: Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo.
- Núcleo Milenio para el Estudio del Dolor (MiNuSPain), Iniciativa Científica Milenio NCN19\_038.

Junto a ello, quisiera agradecer a las siguientes personas:

A mis tutores, el Dr. Gustavo Moraga y el Dr. Gonzalo Yévenes, por su dedicación y el apoyo brindado durante este período de formación, como también por la motivación para continuar estudios de postgrado y mejorar mis competencias profesionales.

A la Dra. María Pertusa y el Dr. Patricio Castro, por su disposición para conformar el comité de evaluación de esta tesis y por aportar con su experiencia e ideas para mejorar este trabajo.

A mis compañeros Ana Marileo, Javiera Gavilán, César Lara, Victoria San Martín, Scarlet Gallegos, Jessica Panes y Anggelo Sazo, quienes han contribuido activamente en mi formación, en el desarrollo de experimentos y en el análisis crítico de este trabajo.

A mis compañeros del grupo, Nicole Espinoza, Katherine Fariña, Santiago Quintana y Paul Soto, por su aporte constante al crecimiento y desarrollo de nuestro grupo de investigación.

A quienes componen el grupo de técnicos/as del Departamento de Fisiología: Ixia Cid, Laurie Aguayo y Omayra Contreras, cuyo aporte sostiene el funcionamiento de todas las actividades desarrolladas en nuestro Departamento.

Finalmente, a mi familia en Ancud, por acompañar y apoyar en la distancia cada una de mis decisiones y procesos personales y profesionales.

## INDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS .....	8
INDICE DE FIGURAS .....	9
ABREVIATURAS .....	11
RESUMEN .....	13
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	17
1.1. PLGICs .....	17
1.2. GABA <sub>A</sub> Rs .....	17
1.3. GABA <sub>A</sub> Rs y desórdenes neurológicos. ....	20
1.4. Agonistas y modulación farmacológica de GABA <sub>A</sub> Rs. ....	20
1.5. Modulación intracelular de GABA <sub>A</sub> Rs .....	21
1.6. Fosforilación de GABA <sub>A</sub> Rs .....	22
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
3.1. Vectores de expresión .....	28
3.2. Transformación bacteriana y purificación de vectores de expresión .....	32
3.3. Cultivo celular y transfección .....	33
3.4. Registros electrofisiológicos en célula completa .....	34
3.5. Registros electrofisiológicos a nivel de canal único .....	35

<b>4. RESULTADOS</b> .....	36
<b>4.1. Efectos de la mutación fosfomimética S410E sobre las propiedades macroscópicas del receptor GABA<sub>A</sub>R <math>\alpha</math>1<math>\beta</math>2 expresado en células HEK293</b>	36
<b>4.2. Efecto de la mutación fosfomimética S410E sobre las propiedades intrínsecas del receptor GABA<sub>A</sub>R <math>\alpha</math>1<math>\beta</math>2 a nivel de canal único.</b>	41
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	46
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros farmacológicos macroscópicos obtenidos a partir de registros electrofisiológicos en célula completa para GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y mutantes de $\beta$ 2 S410E/S410A.....	40
Tabla 2. Parámetros obtenidos a partir de registros electrofisiológicos en canal único para GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y mutantes de $\beta$ 2 S410E/S410A.....	44

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la estructura de los GABA <sub>A</sub> RS.....	19
Figura 2. Mapa de restricción de vector pcDNA3.1(+)	29
Figura 3. Mapa de restricción de vector pIRES2-EGFP.....	30
Figura 4. Mapa de fosforilación de subunidad $\beta$ 2 de GABAAR de <i>R. norvegicus</i> .....	31
Figura 5. Mapa de secuencia de gen <i>GABRAB2</i> de <i>R. norvegicus</i> .....	32
Figura 6. Curvas concentración-respuesta para GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y mutantes de $\beta$ 2 S410E/S410A.....	37
Figura 7. Corrientes máximas para GABAAR $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y mutantes de $\beta$ 2 S410E/S410A.....	39
Figura 8. Densidades de corriente para GABAAR $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y mutantes de $\beta$ 2 S410E/S410A.....	40
Figura 9. Registros electrofisiológicos a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) para corrientes activadas por 10 $\mu$ M de GABA.....	42
Figura 10. Registro electrofisiológico a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) para GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT.....	43
Figura 11. Registro electrofisiológico a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) para GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410E.....	43
Figura 12. Registro electrofisiológico a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) para GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT S410A.....	44

Figura 13. Conductancias (pS) y probabilidad de apertura (NPo) para GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2WT y mutantes de  $\beta$ 2 S410E/S410A.....45

## ABREVIATURAS

PLGICs: Canales iónicos pentaméricos activados por ligando

GABA<sub>A</sub>R: Receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A

GABA<sub>B</sub>R: Receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo B

GlyR: Receptor de glicina

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina

5-HT<sub>3</sub>R: Receptor de 5-hidroxitriptamina tipo 3

ZAC: Canales activados por zinc

GluCl: Canales de Cl<sup>-</sup> activados por glutamato

SNC: Sistema nervioso central

ICD: Dominio intracelular

TMD: Dominio transmembrana

ECD: Dominio extracelular

TBPS: tert-butil biciclo fósforo tionato

THDOC: Tetrahydrodesoxicorticosterona

PKA: Proteína kinasa A

PKC: Proteína kinasa C

PKG: Proteína kinasa G

CAMKII: Ca<sup>2+</sup>/calmodulina kinasa II

AP2: Proteína adaptadora 2

BIG2: Proteína de intercambio de nucleótidos de guanina inhibida por brefeldin A

GABARAP: Proteína asociada al receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GODZ: Proteína de dedos de zinc DHHC (Asp-His-His-Cys) Golgi-específica

Plic-1: Proteína de unión entre la proteína asociada a integrina y citoesqueleto-1

AKAP: Proteína de anclaje asociada a kinasa-A

PRIP-1/2: Proteína relacionada con la fosfolipasa C catalíticamente inactiva 1/2

RACK1: Receptor de proteína kinasa C activada 1

Akt: Transformadora de cepa Ak

PP1c/2A: Proteína fosfatasa 1c/2A

Src tirosina kinasa: Sarcoma Proto-oncogen tirosina kinasa

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

EP<sub>2</sub>R: Receptor 2 de prostaglandina E<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>

pIRES: Plásmido que contiene un sitio interno de entrada al ribosoma

EGFP: Proteína fluorescente verde mejorada

WT: Wild-type

LB: Caldo/medio de lisogenia

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

MEM: Medio esencial mínimo

HEK293: Células embrionarias de riñón humano 293

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-sulfónico

TEA-Cl: Cloruro de tetraetilamonio

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

## RESUMEN

Los receptores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A (GABA<sub>A</sub>Rs) son los principales responsables de la neurotransmisión inhibitoria en el sistema nervioso central (SNC) en mamíferos. Estos receptores pertenecen a la familia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGICs). Cada subunidad que forma el pentámero, presenta una arquitectura común entre todos los miembros de la familia, con el extremo N-terminal (ECD) expuesto hacia el exterior de la membrana, conteniendo el sitio ortostérico, un dominio transmembrana (TMD) compuesto por 4 hélices alfa (TM1-TM4), de los cuales el dominio TM1 está unido al dominio N-terminal, el dominio TM2 delimita el poro central y los dominios TM3-TM4 se encuentran unidos por una larga asa localizada en el dominio intracelular (ICD). En un contexto funcional, el ICD de los GABA<sub>A</sub>Rs es blanco de acción de diversas proteínas quinasas, como PKA y PKC, las cuales regulan la función, el tráfico y expresión de los GABA<sub>A</sub>Rs. Diversos mecanismos moleculares han sido propuestos para explicar la modulación alostérica ejercida por eventos de fosforilación. Estos mecanismos proponen un aumento en la tasa de internalización luego de un evento de fosforilación. Además, se ha propuesto que la fosforilación de residuos en el ICD impacta sobre la estructura del ECD, afectando la afinidad del receptor por su agonista. Sin embargo, aun cuando estos mecanismos parecen plausibles, la posibilidad de que los eventos de fosforilación afecten propiedades intrínsecas del canal, como la probabilidad de apertura o su conductancia no han sido estudiados de forma extensiva. En esta línea, un trabajo reciente en otro miembro de la familia, el receptor de glicina alfa 3 (GlyR  $\alpha$ 3), ha propuesto que la fosforilación del residuo serina 346, localizado en el ICD, reduce de forma significativa la conductancia del canal. Usando registros de canal único en GlyR

$\alpha 3$  que portan una mutación fosfomimética (S346E), los autores reportaron una reducción significativa de las corrientes unitarias, sin cambios en la distribución del receptor en la superficie de la membrana plasmática. En este contexto, debido a la estrecha relación, en términos de estructura, función y farmacología que existe entre los receptores GABA<sub>A</sub>Rs y GlyRs es posible sugerir que los efectos inhibitorios en las corrientes unitarias mediadas por la fosforilación del residuo S346 en el receptor GlyR  $\alpha 3$  pueden constituir un mecanismo de acción conservado en los miembros de la familia. Basados en estos antecedentes, en el presente trabajo proponemos que **“La introducción de una mutación fosfomimética en el residuo S410 en el ICD de la subunidad  $\beta 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> altera la sensibilidad a GABA y la conductancia unitaria del receptor”**. Usando registros electrofisiológicos en la modalidad de célula completa o de canal único se evaluó el efecto de la introducción de una mutación fosfomimética (S410E) en la actividad del receptor GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1\beta 2$ . Los estudios de la respuesta macroscópica a concentraciones crecientes de GABA, mostraron que la introducción de la mutación S410E no tuvo impacto sobre los parámetros de afinidad aparente ( $EC_{50}$ ), corrientes máximas ( $I_{max}$ ) o densidad de corriente ( $J$ ). De manera interesante, los análisis de canal único mostraron que la introducción de la mutación S410E tuvo un impacto significativo en las corrientes unitarias del canal. Este efecto no fue observado cuando se introdujo una mutación no fosfomimética (S410A), indicando un efecto específico del residuo cargado negativamente. De esta forma, el presente trabajo propone que los efectos de una fosforilación en residuos localizados en el ICD pueden ser explicados por una reducción en la conductancia unitaria del canal, el cual es un mecanismo molecular conservado en al menos, dos miembros de la familia pLGICs.

## ABSTRACT

The  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors (GABA<sub>A</sub>Rs) play a critical role controlling the fast inhibitory neurotransmission in the mammalian central nervous system (CNS). These receptors belong to the pentameric ligand-gated ion channels family (pLGICs). Each subunit that forms the pentamer displays a common architecture among all members of the family, with the N-terminal end (ECD) exposed to the outside of the membrane, containing the orthosteric site, a transmembrane domain (TMD) composed of 4 alpha helices, of which TM1 is linked to the N-terminal extracellular domain, TM2 delimits the central pore, and the TM3 and TM4 domains are linked by a large loop located in the intracellular domain (ICD). In a functional point of view, the ICD of GABA<sub>A</sub>Rs is targeted by several protein kinases, such as PKA and PKC, which regulate the function, trafficking, and expression of GABA<sub>A</sub>Rs. Several molecular mechanisms explaining the allosteric modulation exerted by phosphorylation events have been proposed. These mechanisms suggest an increase in the internalization rate after a phosphorylation event. In addition, it has been proposed that the phosphorylation of residues in the ICD have an impact on the structure of the ECD, affecting the affinity of the receptor for its agonist. However, even when these mechanisms seem plausible, the possibility that phosphorylation events affect intrinsic properties of the channel, such as the opening probability or its conductance, has not been extensively studied. In this context, recent work on another member of the family, the glycine receptor alpha 3 ( $\alpha$ 3 GlyR), has proposed that phosphorylation of the serine 346 residue (S346), located in the ICD, significantly reduces channel conductance. Using single channel recordings in  $\alpha$ 3 GlyR carrying a phosphomimetic mutation (S346E), the authors reported a significant reduction in unitary

currents, with no change in receptor distribution on the plasma membrane surface. In this context, due to the close relationship, in terms of structure, function, and pharmacology, which exists between GABA<sub>A</sub>Rs and GlyRs receptors, it is possible to suggest that the inhibitory effects on unitary currents mediated by the phosphorylation of the S346 residue in the  $\alpha 3$  GlyR receptor may constitute a mechanism of action conserved in all family members. Based on this evidence, we propose that the introduction of a phosphomimetic mutation in the S410 residue in the ICD of the  $\beta 2$  subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor alters the sensitivity to GABA and the unitary conductance. Using whole-cell and single-channel electrophysiological recordings, the effect of introducing a phosphomimetic mutation (S410E) on the  $\alpha 1\beta 2$  GABA<sub>A</sub>R activity was evaluated. Studies of the macroscopic response to increasing concentrations of GABA showed that the introduction of the S410E mutation had no impact on apparent affinity ( $EC_{50}$ ), maximum currents ( $I_{max}$ ) or current density (J) parameters. Interestingly, single-channel analysis showed that the introduction of the S410E mutation had a significant impact on unitary channel currents. This effect was not observed when a non-phosphomimetic mutation (S410A) was introduced, indicating a negatively charged residue-specific effect. Thus, the present work proposes that the effects of a phosphorylation in residues located in the ICD, can be explained by a reduction in the unitary conductance of the channel, which is a molecular mechanism conserved in at least two members of the pLGICs family.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PLGICs

Los canales iónicos pentaméricos activados por ligando (PLGICs) son una familia de receptores constituida por los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), los receptores de serotonina (5-HT<sub>3</sub>Rs), los canales activados por zinc (ZAC), los receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>Rs), los receptores GABA<sub>C</sub> (GABA<sub>C</sub>Rs), los receptores de glicina (GlyRs), y los canales de Cl<sup>-</sup> activados por glutamato (GluCl)[1, 2]. Están constituidos por el ensamblaje de cinco subunidades dispuestas alrededor de un poro localizado al centro del canal (Figura 1). El sitio ortostérico se localiza en el dominio N-terminal extracelular (ECD). El dominio transmembrana (TMD), está compuesto de cuatro segmentos denominados TM1-TM4. Los segmentos TM2 recubren el poro, permitiendo el flujo selectivo de iones en la conformación abierta del canal. El asa que une los segmentos TM3 y TM4 se encuentra en el dominio intracelular (ICD) y está involucrado en el tráfico de los receptores a la membrana plasmática, su anclaje en la sinapsis, y su modulación por interacciones intracelulares y modificaciones postraduccionales, como la fosforilación[3-5].

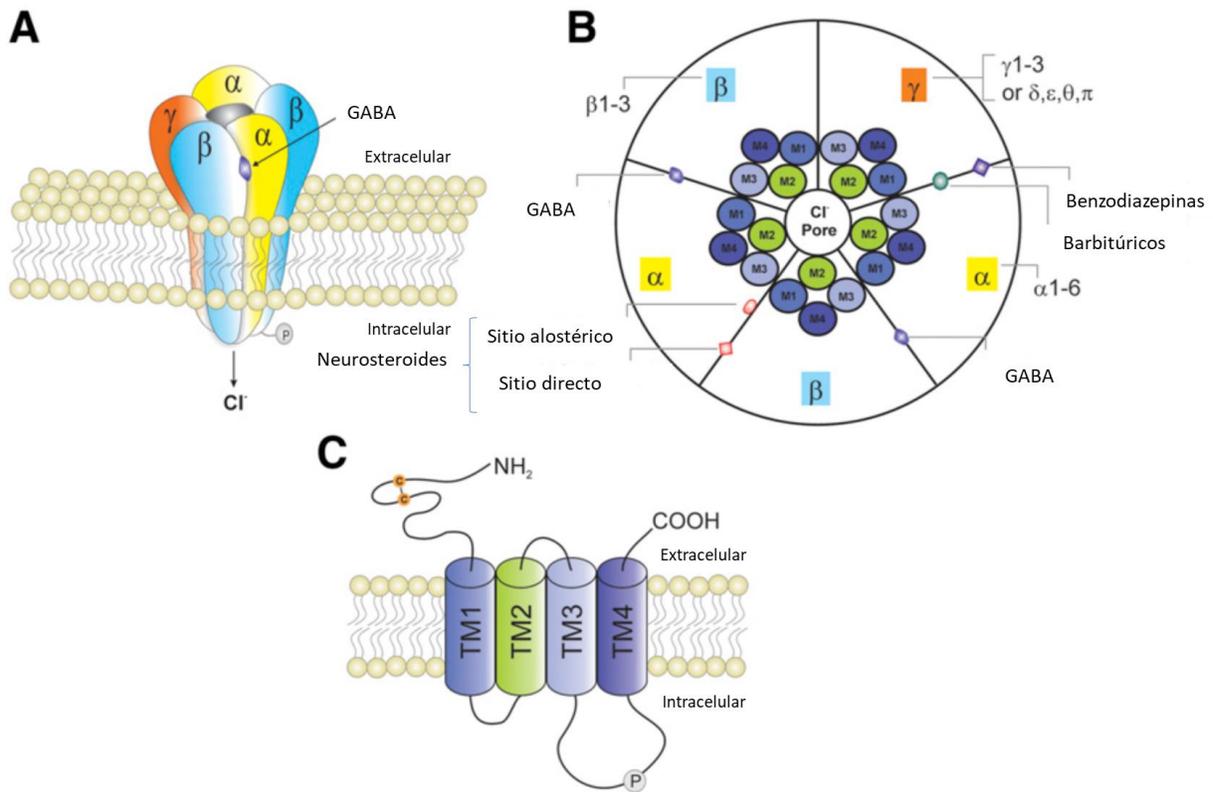
## 1.2. GABA<sub>A</sub>Rs

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos. Las sinapsis GABAérgicas utilizan dos tipos de receptores, denominados receptores de GABA del tipo A (GABA<sub>A</sub>R,

ionotrópicos), los receptores de GABA del tipo B ( $GABA_B$ Rs, metabotrópicos) y los receptores  $GABA_C$  del tipo C ( $GABA_C$ Rs, ionotrópicos). Los  $GABA_A$ Rs permiten el flujo principalmente de  $Cl^-$  en condiciones fisiológicas[6]. Los  $GABA_A$ RS son canales iónicos heteropentaméricos compuestos a partir del ensamblaje de 19 subunidades posibles:  $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ 1-3 (Figura 1) [7]. Sin embargo, sólo existe un número limitado de conformaciones de estos receptores en el sistema nervioso central. El principal subtipo de los  $GABA_A$ Rs está constituido por las subunidades  $\alpha$ 1,  $\beta$ 2 y  $\gamma$ 2, con una estequiometría  $2\alpha$ 1:  $2\beta$ 2:  $1\gamma$ 2, constituyendo aproximadamente el 60% de todos los  $GABA_A$ Rs expresados en el cerebro adulto [8-10]. La heterogeneidad en la composición de estos receptores tiene influencia sobre sus propiedades fisiológicas y farmacológicas[11-13]. Se han observado distintos perfiles de expresión de subunidades específicas en diversas regiones y también durante el desarrollo[14-17]. Por ejemplo, los receptores compuestos por  $\alpha$ 1-3 y  $\gamma$ 2 se encuentran ampliamente localizados en sinapsis, mientras que  $\alpha$ 4-6 y  $\delta$  están expresados extrasinápticamente [18-20].

La actividad inhibitoria de los  $GABA_A$ Rs se puede dividir en dos categorías, denominadas inhibición fásica e inhibición tónica. La inhibición fásica corresponde al aumento de corta duración en la conductancia inhibitoria generada en respuesta a la liberación de GABA al espacio sináptico. A su vez, la inhibición tónica se produce a través de la activación de receptores  $GABA_A$  perisinápticos y extrasinápticos por niveles bajos de GABA que permanecen en el ambiente sináptico[19]. Así, mientras la actividad GABAérgica fásica es de corta duración (del orden de los milisegundos) y permite la sincronización de grupos

neuronales, la transmisión de tipo tónica permite un control inhibitorio sostenido en el tiempo, lo que permite regular el potencial de membrana de manera estable.



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de los GABA<sub>A</sub>RS. (A) Los GABA<sub>A</sub>RS están constituidos por cinco subunidades formando un canal permeable a cloruro. (B) Vista superior del pentámero y sitios de unión de GABA y diversos fármacos. Composición de un receptor ensamblado a partir de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y otras subunidades ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  y  $\pi$ ) en sustitución de la subunidad  $\gamma$ . (C) Vista lateral de una subunidad de los GABA<sub>A</sub>RS. De manera relevante, el extremo N-terminal localizado en el ECD contiene el sitio de unión a ligando, el dominio TM2 forma el recubrimiento poro del canal y el asa intracelular que une los dominios TM3-TM4 (ICD) es blanco de modificaciones postraduccionales, entre ellas la fosforilación. Modificado de [21].

### **1.3. GABA<sub>A</sub>Rs y desórdenes neurológicos.**

Se han descrito una serie de desórdenes neurológicos asociados a la disfunción de GABA<sub>A</sub>Rs. Entre estos desórdenes encontramos epilepsia, enfermedad de Alzheimer, trastorno del espectro autista, retardo en el desarrollo y retraso mental, esquizofrenia y adicción[22-28]. Se han identificado diversas mutaciones asociadas a epilepsia en genes que codifican las subunidades de estos receptores (*GABRA1*, *GABRB3*, *GABRG2* y *GABRD*). En este contexto, se ha descrito que estas mutaciones alteran la función del receptor mediante distintos mecanismos incluyendo reducción en la transcripción o estabilidad del ARNm, perjudicando el plegamiento, estabilidad y oligomerización de las subunidades, e inhibiendo el tráfico de los receptores[29]. La identificación de estos factores ha contribuido a la investigación de potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de las alteraciones mencionadas. Sin embargo, estos trastornos son especialmente complejos y multifactoriales debido a la heterogeneidad de los GABA<sub>A</sub>Rs y la amplia distribución de las neuronas GABAérgicas en el sistema nervioso central.

### **1.4. Agonistas y modulación farmacológica de GABA<sub>A</sub>Rs.**

Los GABA<sub>A</sub>Rs pueden ser activados directamente por GABA y diversos análogos. Junto a GABA, se encuentran otros agonistas de estos receptores como el alcaloide natural muscimol y su análogo tetrahidroisoxazolopiridinol (THIP). En el cerebro, además se encuentran los agonistas endógenos taurina y β-alanina[30]. Entre los antagonistas competitivos de los GABA<sub>A</sub>Rs se encuentran bicuculina y gabazina[31], mientras que los

agentes convulsivos picrotoxina, TBPS, pentilentetrazol y penicilina son considerados como bloqueadores de estos receptores[32, 33]. Por otra parte, compuestos de distinta naturaleza química son capaces de aumentar alostéricamente las corrientes de GABA<sub>A</sub>Rs, entre los que se encuentran barbitúricos y benzodiazepinas[34], así como también etanol[35], neurosteroides (THDOC y alopregnanolona)[36], y anestésicos volátiles e intravenosos (halotano, dietil éter, enflurano, isoflurano, alfaxalona, ketamina y propofol) [37]. Por el contrario, pregnenolona, zinc y furosemida son moduladores alostéricos negativos de estos receptores[38-40]. Se ha descrito que todos estos compuestos mencionados actúan sobre sitios discretos del receptor, localizados principalmente en los dominios extracelular y transmembrana[41]. De modo interesante, muchos de los moduladores GABAérgicos anteriormente mencionados son usados como agentes de uso clínico. En este contexto, es importante destacar a las benzodiazepinas como el grupo de fármacos de primera elección en terapias contra la ansiedad y trastornos del sueño, mientras que, por otro lado, es importante enfatizar la relevancia de propofol como anestésico general ampliamente utilizado en la etapa de inducción del procedimiento de anestesia.

### **1.5. Modulación intracelular de GABA<sub>A</sub>Rs**

Distintos factores endógenos afectan la función y el tráfico de los GABA<sub>A</sub>Rs. Entre estos factores podemos mencionar a proteínas que interactúan con estos receptores como AP2, BIG2, GABARAP, GODZ y Plic-1[42-50], adaptadores asociados a GABA<sub>A</sub>Rs para quinasas y fosfatasas como AKAP, PRIP-1 y -2, RACK1[51-56], proteínas quinasas (PKs) y fosfatasas como Akt, Calcineurin, PKA, PKC, PKC/PP2A, PKA/PP1c, Src[57-63] y

señales extracelulares como BDNF e insulina[64, 65]. La acción de los factores mencionados tiene diversos efectos sobre la modulación de la actividad y expresión en la superficie de GABA<sub>A</sub>Rs[66]. En este contexto, este trabajo se centra en una modificación postraduccional esencial en la regulación de canales iónicos: la fosforilación.

### **1.6. Fosforilación de GABA<sub>A</sub>Rs**

La fosforilación constituye un mecanismo importante que regula la actividad, sensibilidad a moduladores, y el tráfico de los GABA<sub>A</sub>Rs [67]. La regulación de la señalización GABAérgica llevada a cabo por la actividad de quinasas y fosfatasas resulta de fundamental importancia para la neurotransmisión inhibitoria realizada por GABA<sub>A</sub>Rs[66]. Diferentes subunidades de estos receptores pueden ser fosforiladas en residuos de serina, treonina y tirosina localizados en el asa intracelular que une los segmentos M3-M4 (ICD). Estudios previos han demostrado que las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\beta 1-3$  y  $\gamma 2$  son fosforiladas en el ICD por diferentes quinasas, incluyendo PKA, PKC, CAMKII, PKB (AKT), PKG y Src tirosina quinasas[68-71]. En este contexto, una gran parte de los estudios relacionados con fosforilación de GABA<sub>A</sub>Rs se han enfocado en cambios en la expresión y localización celular de los receptores, mientras que, por el contrario, los efectos funcionales de esta modificación postraduccional se han estudiado parcialmente.

A través de técnicas electrofisiológicas y de inmunodetección se han descrito diversos efectos como resultado de la fosforilación por PKA en GABA<sub>A</sub>Rs. En neuronas espinales de ratón, se ha observado que la acción de PKA provoca una disminución de las corrientes de Cl<sup>-</sup> activadas por GABA, como también se ha observado una reducción de

la inmunoreactividad de receptores conteniendo la subunidad  $\beta_3$  frente al tratamiento con forskolina[72, 73]. A su vez, se ha descrito en células HEK293 que la fosforilación dependiente de PKA de GABA<sub>A</sub>R  $\alpha_1\beta_1\gamma_2$  conduce a una inhibición de las respuestas activadas por GABA[74]. Por otra parte, en GABA<sub>A</sub>Rs conteniendo la subunidad  $\beta_3$  se ha observado que la fosforilación del residuo S409 localizado en el ICD por si sola produce una inhibición de las respuestas activadas por GABA, mientras que la acción de PKA sobre los residuos S408 y S409 produce el efecto contrario[75]. Este fenómeno se puede explicar a través de mecanismos diversos. Un primer mecanismo de acción ampliamente descrito es la internalización de GABA<sub>A</sub>Rs inducida por la fosforilación por PKA, como se ha observado en el residuo T375 en  $\alpha_1$ , como también recientemente en el residuo S359 de la subunidad  $\alpha_2$ [68, 76]. PKA también regula de manera indirecta la expresión y función de los GABA<sub>A</sub>Rs, mediante la fosforilación de proteínas de adhesión sinápticas como neuroligin-2 (NL-2) y proteínas que participan como subunidades auxiliares de los receptores como Shisa7[77-79]. Así, la disminución o el aumento de las corrientes macroscópicas asociadas a la activación de GABA<sub>A</sub>Rs frecuentemente se han relacionado a cambios en el número de canales en la membrana, como consecuencia de procesos de inserción, reciclaje o estabilización.

Un aspecto relevante es que los procesos de modificación postraduccionales mediados por proteínas quinasas han sido observados en otros miembros de la superfamilia pLGICs, como los GlyRs[67]. En este contexto, los receptores GABA<sub>A</sub> y GlyRs exhiben diversas características en común, tanto estructurales como funcionales. Ambos receptores son los principales encargados de mediar la neurotransmisión inhibitoria en

el sistema nervioso. Su reclutamiento y anclaje a la membrana postsináptica se encuentra regulado principalmente, entre otros factores, por la interacción entre ICD a las proteínas de andamiaje gephyrin y collybistin[80-83]. Recientemente, se ha descrito en  $\alpha 2$  GABA<sub>A</sub>Rs que esta interacción se encuentra regulada por la actividad de PKA y las fosfatasas PP1/PP2A[68]. En GlyRs por su parte, se ha descrito que PKA fosforila el residuo S346 en la subunidad  $\alpha 3$ , observándose una pérdida de la inhibición glicinérgica tras la activación de receptores EP<sub>2</sub> neuronales por PGE<sub>2</sub>[84].

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito que la fosforilación del residuo S346 por PKA tiene como resultado la disminución de la conductancia unitaria de  $\alpha 3$  GlyRs sin alterar la expresión de superficie del receptor ni la afinidad de éste por su agonista[85]. Cabe además destacar, que en este estudio se generó una mutante fosfomimética para el  $\alpha 3$  GlyR (S346E) que logró reproducir las características a nivel de sensibilidad, expresión y propiedades intrínsecas que exhibió el receptor fosforilado. En este contexto, diversos estudios han descrito que la hélice anfipática (“HA/MA stretch”) localizada en el ICD contiene residuos que participan en la modulación de la conductancia de canal único de los PLGICs, una propiedad intrínseca de los canales asignada tradicionalmente a las regiones que configuran el poro iónico [86-93]. A pesar de su relevancia, la posibilidad de que modificaciones postraduccionales en el ICD modifiquen la conductancia de los PLGICs aun ha sido mínimamente explorada. En conjunto, estos resultados sugieren que el control de la conductancia por fosforilación de residuos del ICD puede ser un mecanismo conservado de modulación funcional en otros PLGICs, lo que incluye los GABA<sub>A</sub>Rs. Junto a ello, cabe mencionar que el empleo

de una mutante fosfomimética (residuos de serina/treonina substituidos por glutamato o aspartato) y su control no fosforilable (residuos de serina/treonina substituidos por alanina) constituye entonces una estrategia de gran utilidad como modelo de fosforilación de residuos individuales.

De acuerdo con la variedad de antecedentes que revelan un alto grado de homología, funcional, estructural y farmacológica entre los GABA<sub>A</sub>Rs y GlyRs[67, 68, 80-83], es posible sugerir que el control de la conductancia mediada por PKA en el receptor  $\alpha 3$  GlyR son extrapolables al GABA<sub>A</sub>R. En este sentido, las subunidades  $\beta$  de los GABA<sub>A</sub>Rs destacan por mostrar varios sitios consenso conservados que actúan como blancos de acción de varias proteínas quinasas de tipo serina/treonina. Mediante mutación sitio-dirigida, se han descrito los residuos S409 ( $\beta 1$ ), S410 ( $\beta 2$ ) y S408/409 ( $\beta 3$ ) como los principales sitios de fosforilación por quinasas como PKA, PKG, PKC y CAMKII. [59, 94, 95]. Además, se ha descrito en neuronas que la fosforilación mediada por estas quinasas puede modular positiva o negativamente la función de GABA<sub>A</sub>Rs dependiendo las condiciones experimentales[96-99]. Dado que la fosforilación de estos residuos posee un rol crítico en la modulación de la función de GABA<sub>A</sub>Rs que poseen subunidades  $\beta$ , es posible que estos residuos sean relevantes para la conductancia del canal.

Considerando estos antecedentes, se decidió estudiar los efectos funcionales provocados por fosforilación en GABA<sub>A</sub>R compuestos de subunidades  $\alpha 1\beta 2$ . La expresión de GABA<sub>A</sub>Rs compuestos de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  constituye una estrategia de gran utilidad para el estudio de los GABA<sub>A</sub>RS en modelos heterólogos, dado que forman

canales heteropentaméricos funcionales compuestos a partir de 2 subunidades. Cabe mencionar, además, que la expresión homomérica de receptores  $\alpha 1$  o  $\beta 2$  no conduce a la expresión de receptores en la membrana funcionales [100]. Finalmente, es necesario destacar que el estudio de GABA<sub>A</sub>Rs de configuración  $\alpha 1\beta 2$  es relevante en un contexto neurofisiológico, ya que son expresados en el SNC a nivel extrasináptico y median, en parte, la inhibición tónica de las neuronas piramidales de hipocampo [100-102].

En consecuencia, a través de técnicas electrofisiológicas y mutaciones sitio-dirigidas, se analizó el efecto de la sustitución del residuo S410 por glutamato (mutación fosfomimética) y por alanina (mutación control no fosforilable) en GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1\beta 2$ . Como parámetros funcionales, se evaluaron: i) La sensibilidad a GABA del receptor (cuantificada como EC<sub>50</sub>), ii) La expresión funcional de receptores a nivel de membrana (cuantificada como densidad de corriente máxima) y iii) Las corrientes unitarias del receptor, lo que, a través del registro de canales únicos, permite calcular la conductancia del canal y su probabilidad de apertura. De ese modo, el presente trabajo pretende iniciar un estudio sistemático que logre establecer la potencial relevancia del ICD en la regulación de la conductancia de GABA<sub>A</sub>Rs, lo que incluye la modificación química reversible de residuos de serina y treonina por fosforilación.

## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

La incorporación de una mutación fosfomimética en el residuo S410 en el ICD de la subunidad  $\beta 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> altera la sensibilidad a GABA y la conductancia unitaria del receptor.

### Objetivo general

Determinar los efectos funcionales de la mutación fosfomimética en el residuo S410 en el ICD de la subunidad  $\beta 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> mediante técnicas electrofisiológicas.

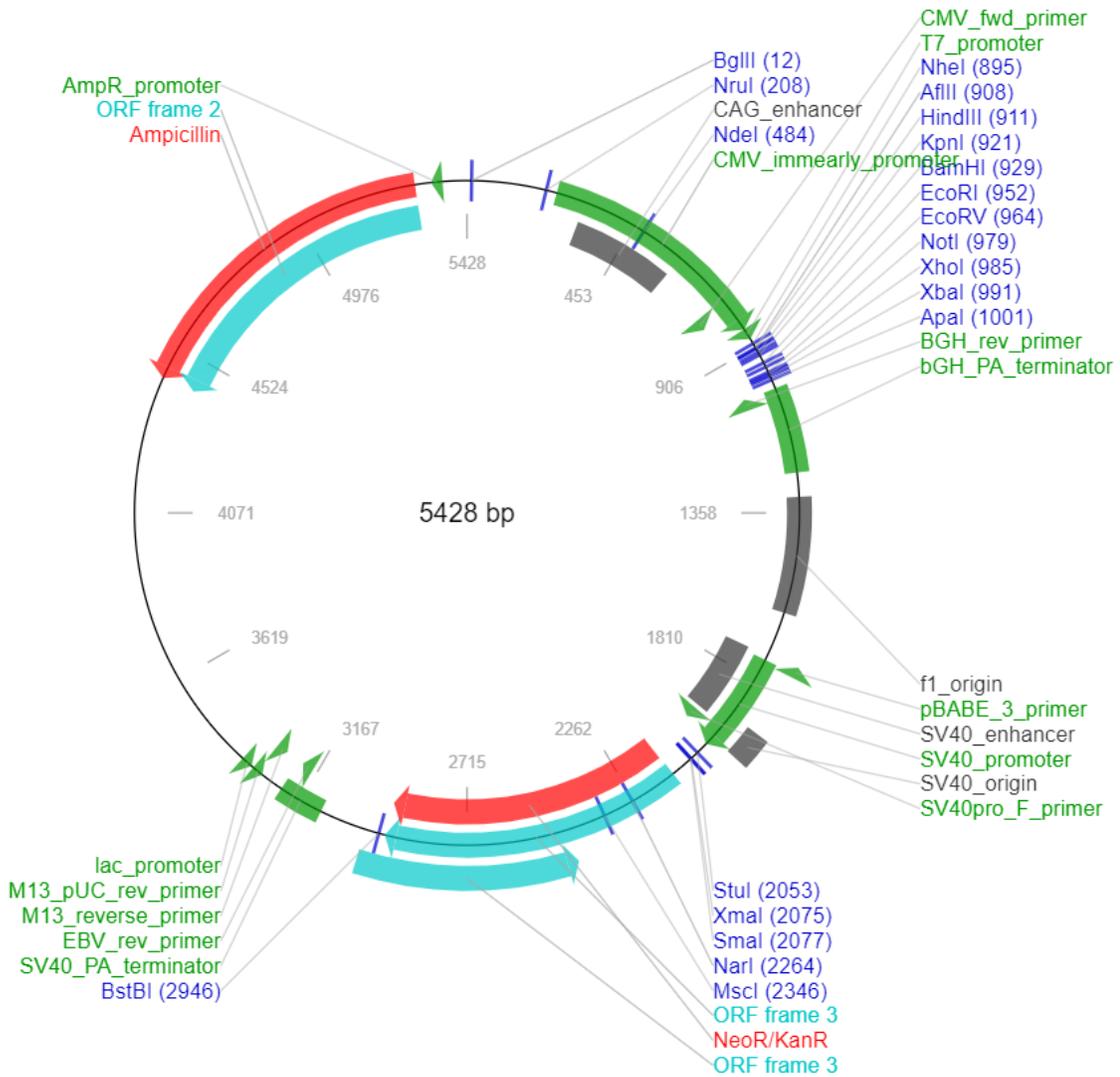
### Objetivos específicos

1. Caracterizar las propiedades electrofisiológicas funcionales del receptor GABA<sub>A</sub>  $\alpha 1\beta 2$  wild-type (WT).
2. Determinar la relevancia del residuo  $\beta 2$  S410 sobre las propiedades electrofisiológicas macroscópicas del GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1\beta 2$  mediante la expresión de una mutante fosfomimética  $\beta 2$  S410E y su control no fosforilable  $\beta 2$  S410A.
3. Determinar la relevancia del residuo  $\beta 2$  S410 de GABA<sub>A</sub>Rs  $\alpha 1\beta 2$  en la conductancia unitaria del canal mediante el estudio de la mutante fosfomimética  $\beta 2$  S410E y su control no fosforilable  $\beta 2$  S410A.

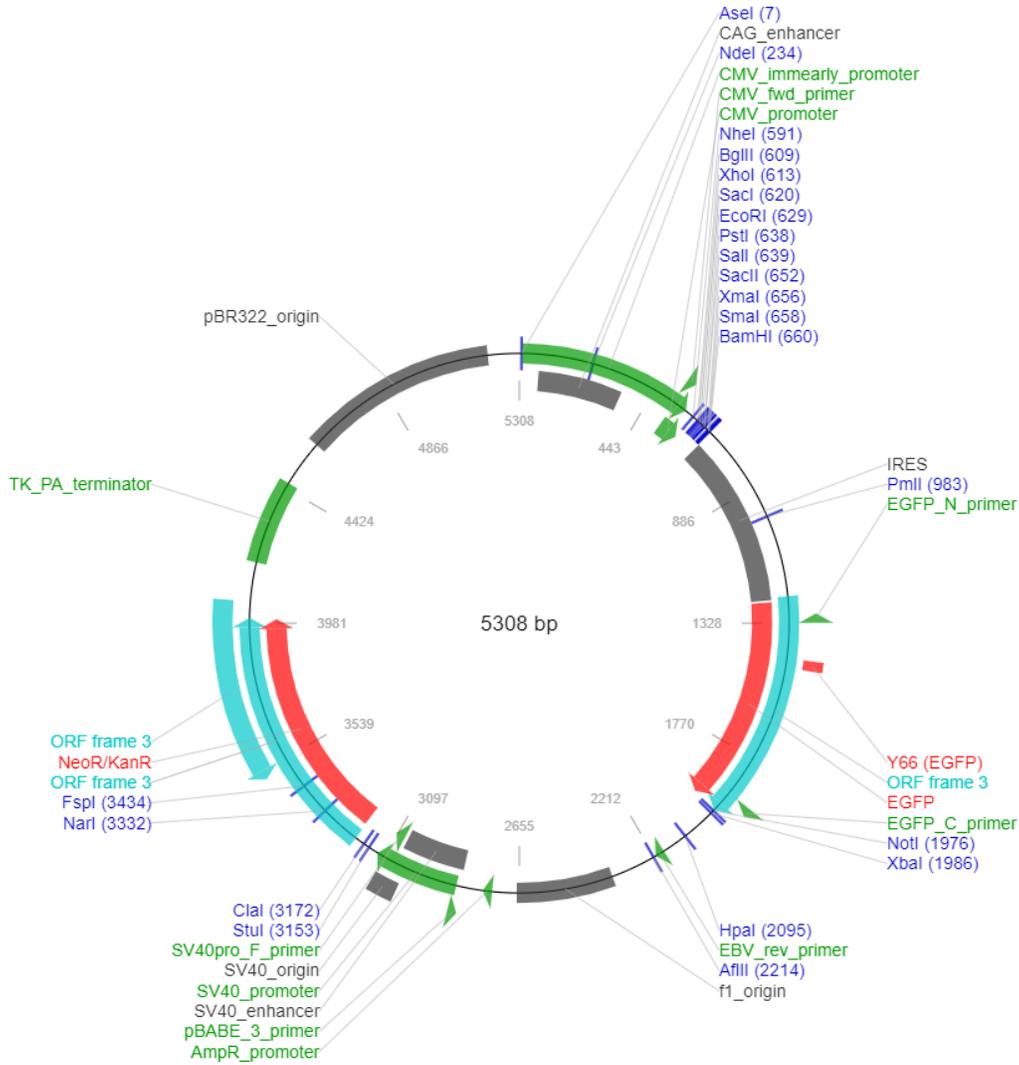
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Vectores de expresión

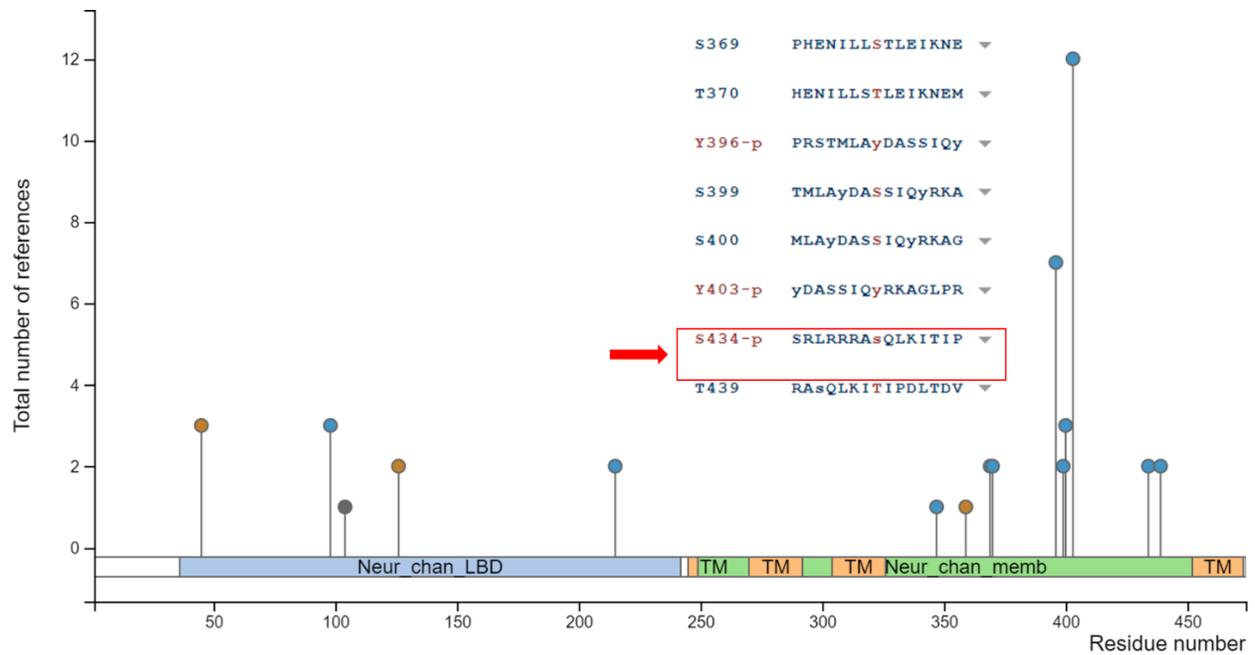
Se utilizaron los siguientes vectores de expresión: GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 en pcDNA3.1(+), GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 en pIRES2-EGFP, GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 S410E en pIRES2-EGFP y GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 S410A en pIRES2-EGFP (Biomatik) (Figuras 2-3). El vector para GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 se amplificó desde el banco de plásmidos del Departamento de Fisiología. Los vectores para GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2/  $\beta$ 2S410E se construyeron a partir de la secuencia codificante del gen GABRAB2 de *R. norvegicus* (NCBI Reference Sequence: NM\_012957.2). Para la construcción de la mutante S410E, se buscó el residuo S410 dentro del sitio consenso de fosforilación RRRASQLK[71]. Luego, se corroboró la localización de dicho residuo en el sitio PhosphoSite Plus® (Cell Signaling Technology, Inc.), donde se observó que la secuencia consenso mencionada contiene el residuo de Ser de interés (Figura 4). Con esta nueva posición del residuo de Ser, el codón correspondiente (TCC) en la secuencia codificante se reemplazó por GAA (S/E) o TCC (S/A) (Figura 5) mediante el software Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, Inc). Posteriormente, las secuencias codificantes nativa y mutantes se introdujeron independientemente en el vector pIRES2-EGFP y los vectores diseñados se importaron (Biomatik) para su utilización en este trabajo. Los vectores (5  $\mu$ g) se resuspendieron en 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Winkler Ltda.).



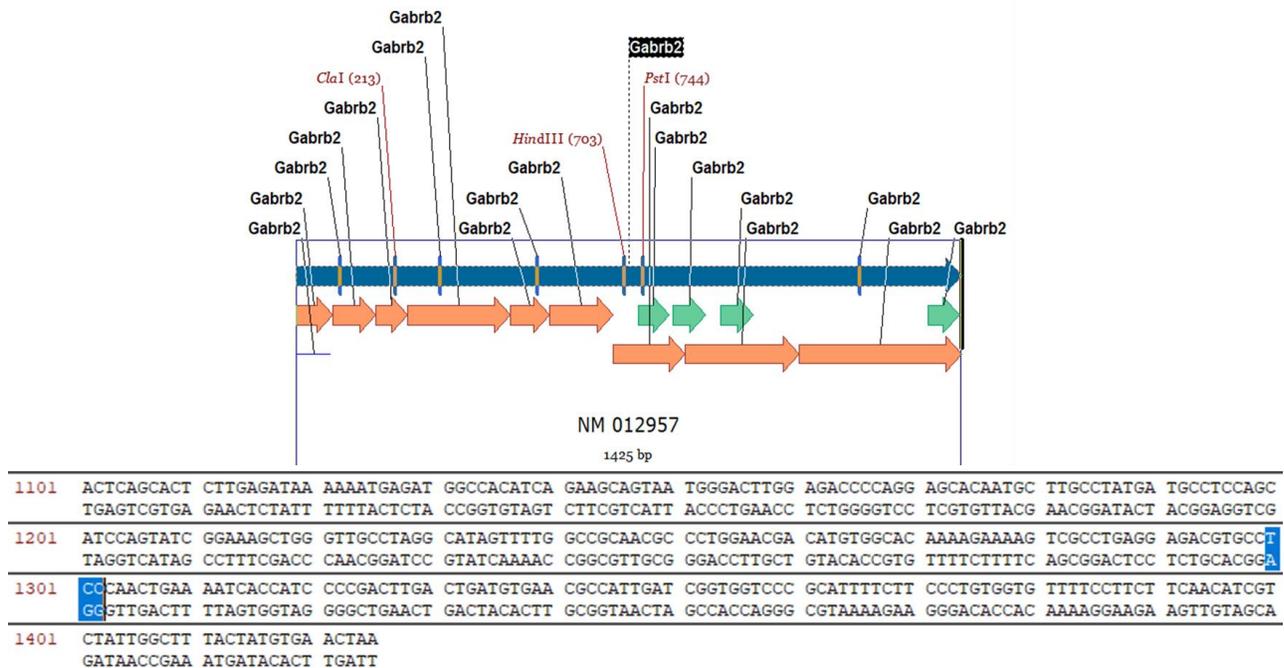
**Figura 2.** Mapa de restricción de vector pcDNA3.1(+). Este vector posee un tamaño de 5,3 kb y se encuentra bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (CMV). El pcDNA3.1(+) posee un gen de resistencia a ampicilina para seleccionar bacterias transformadas (Invitrogen Corporation).



**Figura 3.** Mapa de restricción de vector pIRES2-EGFP. Este vector posee un tamaño de 5,3 kb y contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de encefalomiocarditis (EMCV) entre el sitio de multiclonamiento (MCS) y la región codificante para EGFP. Esto permite que tanto el gen de interés (clonado en el MCS) como el gen que codifica para EGFP se traduzcan desde un mRNA bicistrónico sencillo. El MCS se encuentra entre el promotor temprano de citomegalovirus (CMV) y la secuencia IRES. El pIRES2-EGFP posee un gen de resistencia a kanamicina para seleccionar bacterias transformadas (Clontech Laboratories, Inc.).



**Figura 4.** Mapa de fosforilación de subunidad  $\beta 2$  de GABA<sub>A</sub>R de *R. norvegicus* (PhosphoSite Plus®, Cell Signaling Technology, Inc.). El residuo de Ser de interés (S410) se localizó en la secuencia consenso descrita, en la posición 434.



**Figura 5.** Mapa de secuencia de gen *GABRAB2* de *R. norvegicus*. La secuencia del gen *GABRAB2* de *R. norvegicus* (NCBI Reference Sequence: NM\_012957.2) se introdujo en el programa Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, Inc). En la parte inferior se muestra un fragmento de la secuencia codificante (1101-1425 bp) que incluye el codón TCC (1301-1303 bp) destacado en azul, que codifica para el residuo de interés (S434) localizado en la secuencia consenso descrita.

### 3.2. Transformación bacteriana y purificación de vectores de expresión

Para la amplificación y purificación de vectores de expresión, se transformaron bacterias *Escherichia coli* XL1-blue químicamente competentes con 1  $\mu$ L de ADN plasmidial (300 ng de GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1, 100 ng de GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 WT y mutantes) mediante incubación durante 15 minutos a 4°C. Las bacterias transformadas con GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina sódica 100  $\mu$ g/mL (AK Scientific), mientras que las bacterias transformadas con GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 WT y mutantes se sembraron en placas de LB-agar con

kanamicina sulfato 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (US Biological). Las placas se incubaron durante 12-16 horas a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron colonias desde las placas y se incubaron durante 12-16 horas a 37°C en 15 mL de medio LB suplementado con los antibióticos de selección mencionados. Finalmente, los plásmidos se purificaron (Omega BIO-TEK), se cuantificó su concentración de ADN y se almacenaron a -20°C.

### **3.3. Cultivo celular y transfección**

Para los cultivos celulares se utilizaron células HEK293 (ATCC CRL 1573) en DMEM (Corning, Inc.) suplementado con 10% HyClone FBS (Thermo Fisher Scientific, Inc.), y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se prepararon sobre cubreobjetos de 18 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co.) en placas de 12 pocillos (SPL Life Sciences). Las células se transfectaron transientemente con 0,5  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$  cDNA de Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y 1  $\mu\text{g}$  de cDNA/subunidad de los siguientes vectores: GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1, GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2, GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 S410E y GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ 2 S410A en 50  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de Opti-MEM 1X (Thermo Fisher Scientific, Inc)[61, 103]. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo 24 horas post-transfección. La expresión de EGFP se utilizó como reportera de células transfectadas positivamente[104].

### 3.4. Registros electrofisiológicos en célula completa

Las corrientes activadas por GABA se registraron a temperatura ambiente desde las células HEK293 transfectadas transientemente EGFP-positivas, mediante registros electrofisiológicos en configuración de célula completa (whole-cell). Las pipetas de registro (Sutter Instrument Company) se prepararon en un puller (Narishige Group) y posteriormente se pulieron manualmente en una microforja (Narishige Group) para conseguir una resistencia de 3-4 M $\Omega$ . Se utilizó una solución interna conteniendo (mM): 120 CsCl, 8 EGTA, 10 HEPES (pH 7.4), 4 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 GTP and 2 ATP. La solución externa (mM): 140 NaCl, 5.4 KCl, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES (pH 7.4), y 10 glucosa. Los registros se llevaron a cabo con un amplificador Axoclamp 200B (Molecular Devices, USA). Las curvas concentración/respuesta se realizaron mediante la aplicación de pulsos de GABA (1-1000  $\mu$ M, Sigma) desde un sistema de perfusión. Las corrientes activadas por GABA se registraron en modo voltage-clamp a -60 mV mediante un amplificador Axoclamp 200B (Molecular Devices,LLC) y se digitalizaron a través de software Clampex 10.1 (Molecular Devices,LLC). Los registros se analizaron mediante Origin 6.0 (Microcal Software, Inc.) y Clampfit 10.7.0.3 (Molecular Devices,LLC)[85].

### **3.5. Registros electrofisiológicos a nivel de canal único**

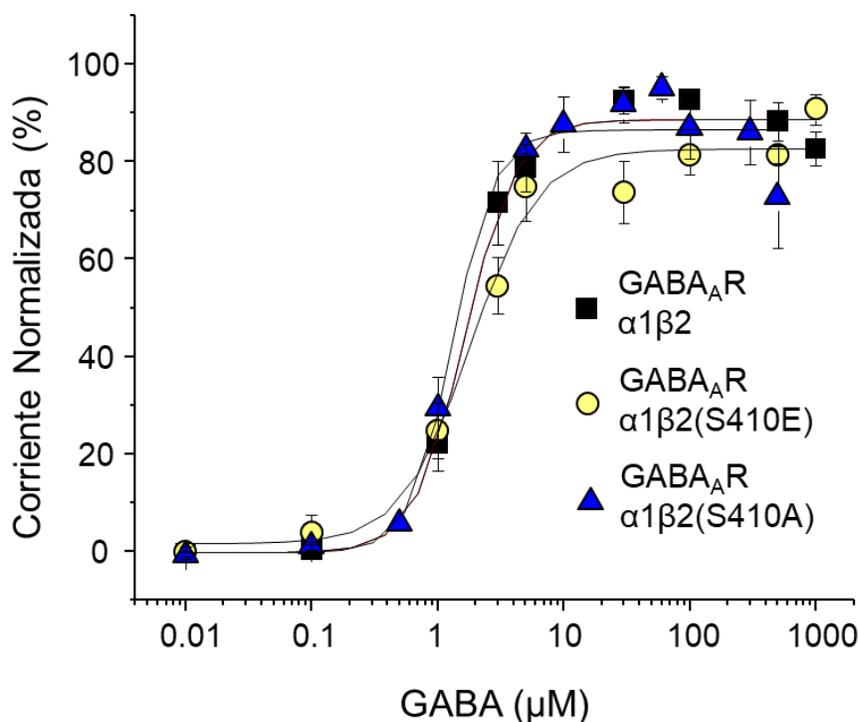
Las corrientes activadas por GABA se registraron a temperatura ambiente desde las células HEK293 transfectadas transientemente EGFP-positivas, mediante registros electrofisiológicos a nivel de canal único (single-channel), en configuración cell-attached. Las pipetas de registro (Sutter Instrument Company) se prepararon en un puller (Narishige Group) y posteriormente se pulieron manualmente en una microforja (Narishige Group) para conseguir una resistencia de 8-12 M $\Omega$ . Se utilizó una solución externa conteniendo (mM): 150 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl, 10 HEPES, 20 TEA-Cl, 15 sacarosa y 14 glucosa. Para la solución interna se utilizó la solución externa más 10  $\mu$ M GABA (Sigma)

Las corrientes activadas por GABA se registraron en modo voltage-clamp a -100 mV mediante un amplificador (HEKA Elektronik GmbH) y se digitalizaron a través de software PatchMaster v2x73.2 (HEKA Elektronik GmbH). Los registros se analizaron mediante Origin 6.0 (Microcal Software, Inc.) y Clampfit 10.7.0.3 (Molecular Devices,LLC)[85].

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efectos de la mutación fosfomimética S410E sobre las propiedades macroscópicas del receptor GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 $\beta$ 2 expresado en células HEK293

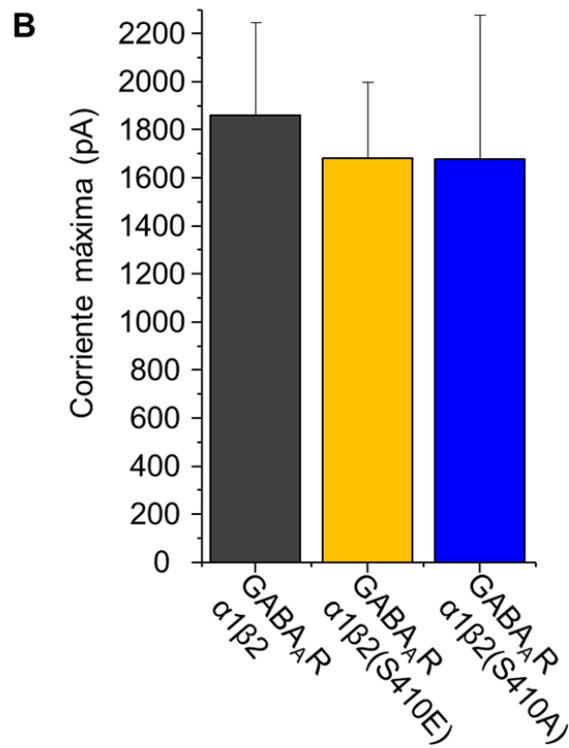
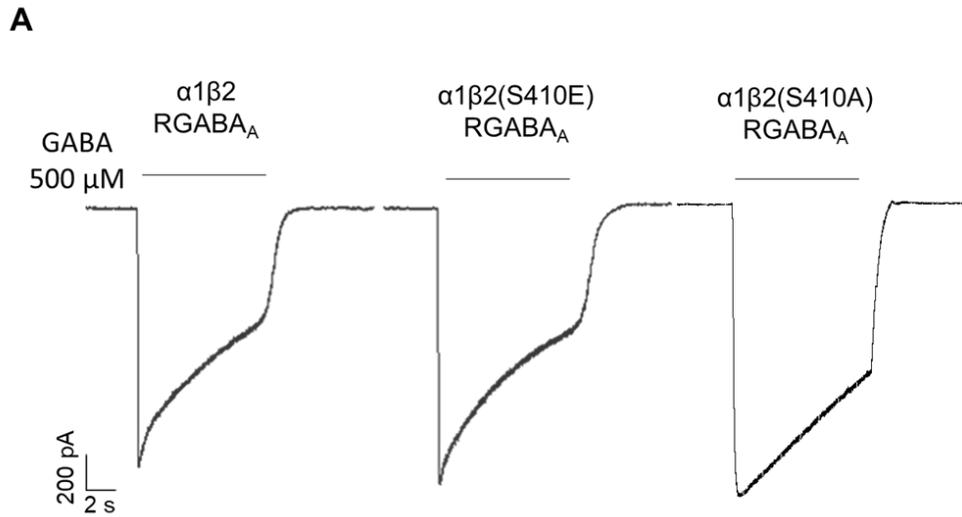
Para evaluar la relevancia de la mutación fosfomimética S410E sobre las propiedades macroscópicas de GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2, las subunidades se expresaron en células HEK293 y se registraron en configuración de célula completa. Como control no fosforilable, se estudió la mutante  $\beta$  S410A. En una primera etapa, se analizó el efecto de ambas mutaciones sobre la sensibilidad a GABA del receptor mediante la construcción de curvas concentración-respuesta (0.01-500  $\mu$ M GABA). No se observaron diferencias significativas en los EC<sub>50</sub> obtenidos para el receptor GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y los receptores que expresaron  $\beta$ 2 mutantes. Para el receptor WT se obtuvo un EC<sub>50</sub>=1.63 $\pm$ 0.16, mientras que para el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410E se obtuvo un EC<sub>50</sub>=1.79 $\pm$ 0.32 y para el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410A EC<sub>50</sub>=1.30 $\pm$ 0.25 (Figura 6 y Tabla 1). Otros parámetros farmacológicos obtenidos desde las curvas concentración respuesta, como el coeficiente de Hill, las corrientes máximas y las densidades de corriente, tampoco exhibieron diferencias significativas (Figura 7 y Tabla 1).



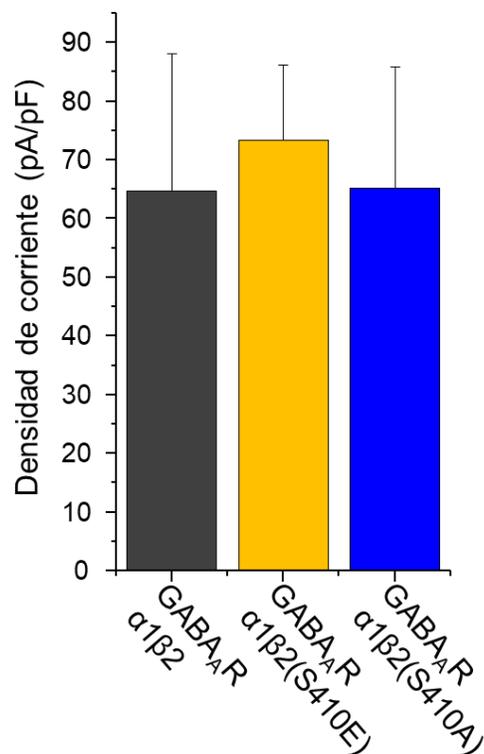
**Figura 6.** Curvas concentración-respuesta para GABA<sub>A</sub>R α1β2 WT y mutantes de β2 S410E/S410A. Gráficas de corrientes activadas por GABA (0.01-500 μM) normalizadas para GABA<sub>A</sub>R α1β2 (■), GABA<sub>A</sub>R α1β2 S410E (●) y GABA<sub>A</sub>R α1β2 S410A (▲).

La fosforilación de los GABA<sub>A</sub>Rs cumple un rol importante en la regulación de la presencia de estos receptores en la membrana postsináptica, contribuyendo a su vez con la regulación de la eficacia de la neurotransmisión inhibitoria[73, 76, 105]. Una estrategia para analizar la expresión de receptores a nivel de membrana es cuantificar la relación entre la corriente máxima evocada por GABA y la capacitancia de la membrana celular. La capacitancia es un parámetro fundamental de las células y es proporcional al área de la superficie celular[106]. Por lo tanto, es posible determinar cambios en la expresión de receptores en la membrana a través del análisis de las densidades de corriente que se obtienen al normalizar las corrientes máximas respecto a la capacitancia celular. Como

una aproximación a posibles efectos en la expresión de membrana de los receptores, se analizó el efecto de la mutación del residuo  $\beta 2$  S410 sobre las densidades de corrientes obtenidas a partir de registros electrofisiológicos en célula completa al emplear 500  $\mu\text{M}$  de GABA. Para el receptor WT se obtuvo una densidad de corriente de  $64.84 \pm 23.40$  pA/pF, mientras que para el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1\beta 2$  S410E se obtuvo  $73.51 \pm 12.77$  pA/pF, y para el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1\beta 2$  S410A  $65.34 \pm 20.57$  pA/pF (Figuras 7 y 8, Tabla 1). Las corrientes máximas tampoco fueron significativamente diferentes. Estos resultados indican que la mutación S410E en la subunidad  $\beta 2$  de los GABA<sub>A</sub>Rs no alteró significativamente la expresión del receptor a nivel de membrana.



**Figura 7.** Corrientes máximas para GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y mutantes de  $\beta$ 2 S410E/S410A. Las diferencias de corrientes máximas no fueron significativas ( $p=0,9373$ ) (ANOVA unidireccional con post hoc de Bonferroni; \*, $p<0,05$ ).



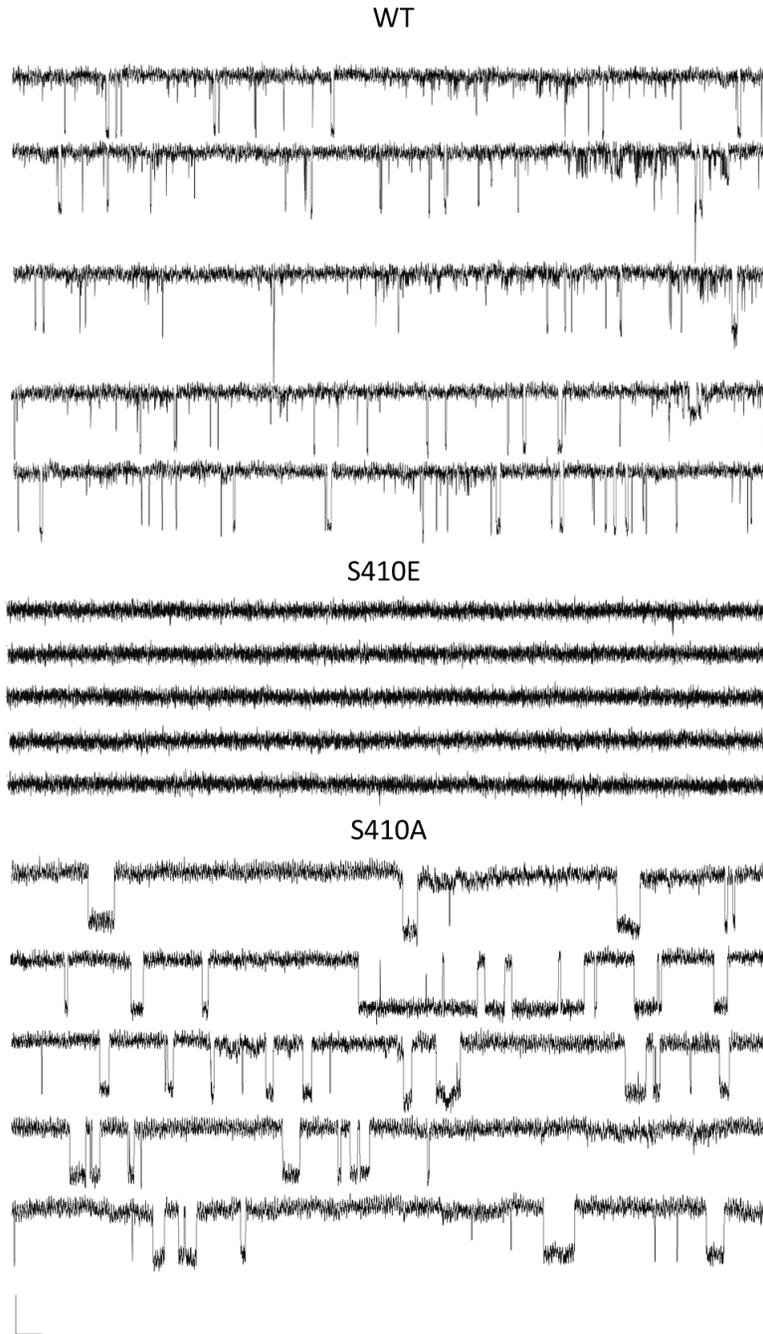
**Figura 8.** Densidades de corriente para GABA<sub>A</sub>R α1β2 WT y mutantes de β2 S410E/S410A. Las diferencias de densidades de corriente no fueron significativas (p=0,7456) (ANOVA unidireccional con post hoc de Bonferroni; \*,p<0,05)

**Tabla 1.** Parámetros farmacológicos macroscópicos obtenidos a partir de registros electrofisiológicos en célula completa para GABA<sub>A</sub>R α1β2 WT y mutantes de β2 S410E/S410A.

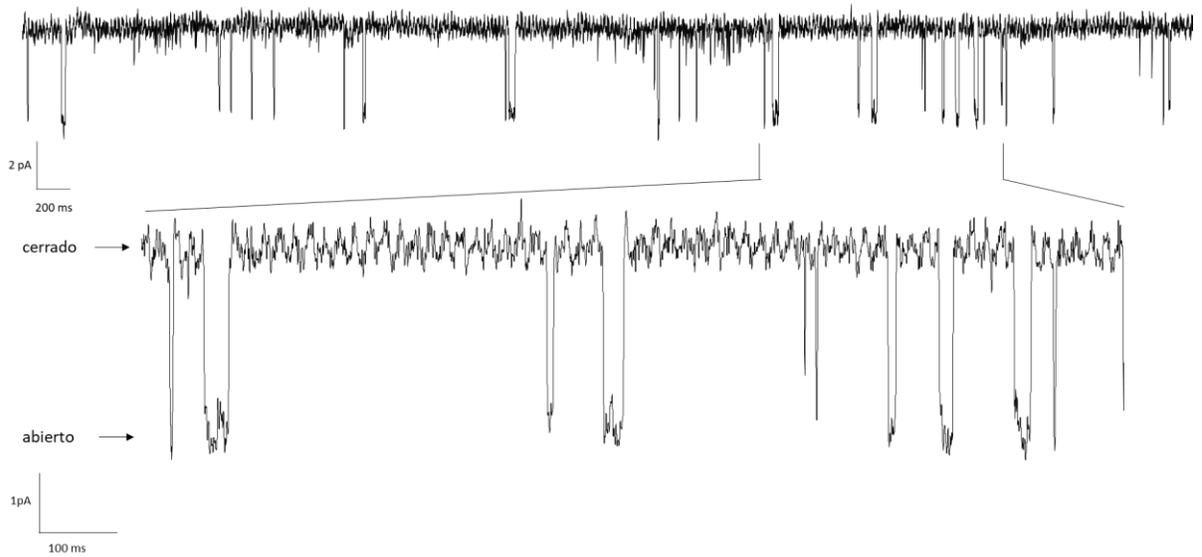
GABA <sub>A</sub> R	EC <sub>50</sub> (μM)	nH	I <sub>max</sub> (pA)	Densidad de corriente (pA/pF)	n
α1β2	1.63±0.16	2.16±0.31	1864.25±388.24	64.84±23.40	8
α1β2 S410E	1.79±0.32	1.61±0.39	1683.62±321.99	73.51±12.77	8
α1β2 S410A	1.30±0.25	2.56±1.21	1681±602.18	65.34±20.57	4

#### **4.2. Efecto de la mutación fosfomimética S410E sobre las propiedades intrínsecas del receptor GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 $\beta$ 2 a nivel de canal único.**

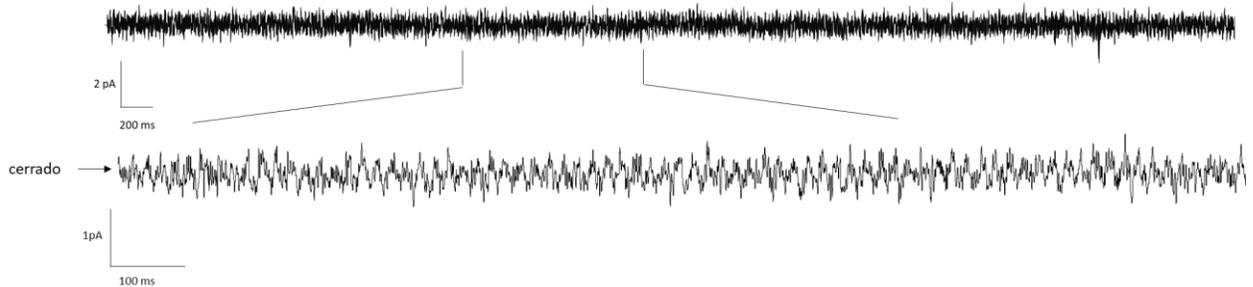
Con el objetivo de evaluar el efecto de la mutación del residuo  $\beta$ 2 S410 sobre las propiedades intrínsecas del receptor GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2, se realizaron registros electrofisiológicos a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) a -100 mV en el receptor WT y las mutantes  $\beta$ 2 S410E y S410A (Figura 9). Para el receptor WT, se observaron registros que exhibieron apertura y cierre de canales, con una amplitud promedio de  $2,28 \pm 0,55$  pA (Figuras 9 y 10, Tabla 2). En el caso del GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410E, no se logró detectar actividad del receptor en forma de conductancias regulares de apertura y cierre (Figuras 9 y 11, Tabla 2). A su vez, los registros con GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410A también exhibieron apertura y cierre de canales, con una amplitud promedio de  $1,52 \pm 0,71$  pA (Figuras 9 y 12, Tabla 2). Con los valores individuales de amplitud promedio respecto al potencial eléctrico aplicado, se calcularon las conductancias para cada receptor. Para el receptor WT se observó una conductancia de  $20,57 \pm 5,39$  pS (Figura 13, Tabla 2). A su vez, el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410A exhibió una conductancia de  $19,44 \pm 8,51$  pS (Figura 13, Tabla 2). En cuanto a la probabilidad de apertura (NPo), el receptor WT exhibió un NPo de  $0,12 \pm 0,16$  y el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410A de  $0,21 \pm 0,21$  (Figura 13, Tabla 2). En el caso del GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410E, dado que las corrientes unitarias no fueron detectadas (Figuras 9 y 11), no se calcularon las conductancias ni el NPo (Figura 13). Estos resultados sugieren que la mutación S410E redujo la amplitud unitaria del canal a niveles no detectables, lo que implica que la mutación redujo la conductancia del receptor a valores menores de 5-7 pS.



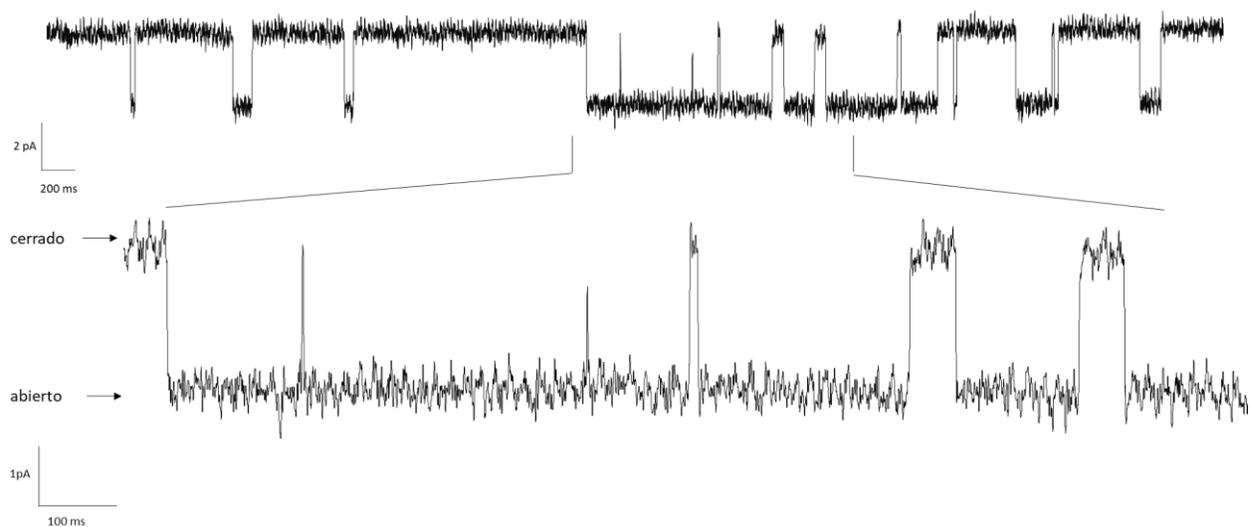
**Figura 9.** Registros electrofisiológicos a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) para corrientes activadas por 10  $\mu$ M de GABA. GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT (-100 mV) y mutantes  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410E (-100 mV) y S410A (-100 mV). Barra de calibración: 2 pA/200 ms.



**Figura 10.** Registro electrofisiológico a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) para GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT. Corrientes activadas por 10  $\mu$ M de GABA (-100 mV). Barras de calibración: 2 pA/200 ms y 1 pA/100 ms.



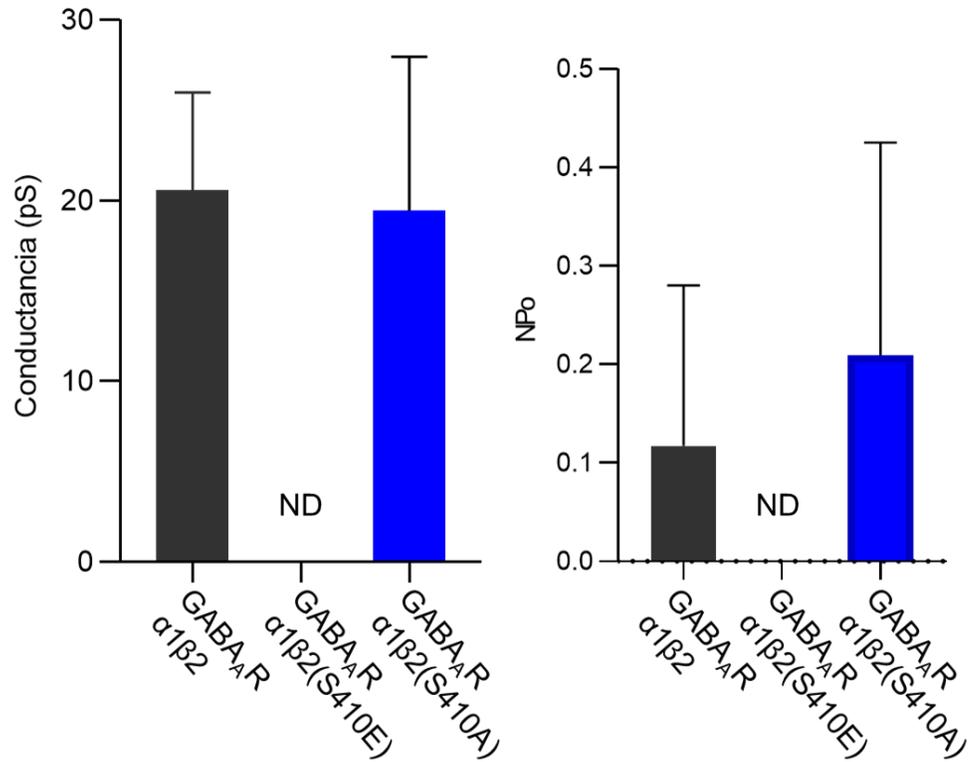
**Figura 11.** Registro electrofisiológico a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) para GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410E. Corrientes activadas por 10  $\mu$ M de GABA (-100 mV). Barras de calibración: 2 pA/200 ms y 1 pA/100 ms.



**Figura 12.** Registro electrofisiológico a nivel de canal único (single-channel voltage-clamp) para GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410A. Corrientes activadas por 10  $\mu$ M de GABA ( -100 mV). Barras de calibración: 2 pA/200 ms y 1 pA/100 ms.

**Tabla 2.** Parámetros obtenidos a partir de registros electrofisiológicos a nivel de canal único para GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y mutantes de  $\beta$ 2 S410E/S410A.

GABA <sub>A</sub> R	Conductancia (pS)	NPo	n
$\alpha$ 1 $\beta$ 2	20.57 $\pm$ 5.39	0.12 $\pm$ 0.16	11
$\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410E	ND	ND	7
$\alpha$ 1 $\beta$ 2 S410A	19.44 $\pm$ 8.51	0.21 $\pm$ 0.21	9



**Figura 13.** Conductancias (pS) y probabilidad de apertura (NPo) para GABA<sub>A</sub>R α1β2 WT y mutantes de β2 S410E/S410A. ND, no detectado. Las diferencias de conductancias entre GABA<sub>A</sub>R α1β2 WT y mutante S410A no fueron significativas (p=0,7214) (Prueba t.de Student no pareada; \*p<0,05). Las diferencias de probabilidad de apertura (NPo) entre GABA<sub>A</sub>R α1β2 WT y mutante S410A no fueron significativas (p=0,2925) (Prueba t.de Student no pareada; \*p<0,05).

## 5. DISCUSIÓN

Los eventos de fosforilación modulan la funcionalidad de los distintos miembros de la familia de PLGICs. La neurotransmisión inhibitoria realizada por los GABA<sub>A</sub>Rs es estrechamente regulada por la actividad de quinasas y fosfatasas [67, 70, 72, 107, 108]. En este contexto, las subunidades  $\beta$  de los GABA<sub>A</sub>Rs son blanco de esta regulación a través de la fosforilación de los residuos S409 ( $\beta$ 1), S410 ( $\beta$ 2) y S408/409 ( $\beta$ 3), localizados en el asa intracelular que conecta los dominios M3-M4 [71, 95, 108]. En este trabajo se utilizó un modelo de fosforilación para el residuo S410 de la subunidad  $\beta$  del GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2. Este modelo consistió en introducir un residuo cargado negativamente en reemplazo del residuo S410 (S410E), cuyo objetivo fue imitar la carga negativa del grupo fosfato (fosfomimético). Se cumplieron los objetivos específicos propuestos para este trabajo: Se expresó el receptor GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y sus mutantes (S410E/S410A), observándose a través de registros electrofisiológicos en célula completa que no se alteraron significativamente las propiedades macroscópicas (expresadas como EC<sub>50</sub>, amplitudes de corrientes máximas y densidad de corriente) al comparar el receptor WT y los receptores conteniendo  $\beta$ 2 mutantes. A nivel de canal único, los resultados sugieren una disminución importante de las amplitudes de corriente y, por consiguiente, de la conductancia unitaria de la mutante fosfomimética respecto al receptor WT y la mutante S410A. Estos resultados logran responder a la hipótesis de trabajo, indicando que la modificación química del residuo S410 al introducir un grupo con carga negativa no altera la sensibilidad del receptor ni su expresión a nivel de membrana, sin embargo, altera la conductancia unitaria del receptor.

Los GABA<sub>A</sub>RS forman heteropentámeros funcionales a partir del ensamblaje de 19 subunidades posibles. No obstante, en el SNC se expresa un número limitado de conformaciones[7-10]. La heterogeneidad en la composición de estos receptores se ve reflejada sobre su localización, funcionalidad y farmacología[11-13]. La expresión de receptores compuesta a partir de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  produce un canal heteropentamérico funcional permeable a Cl<sup>-</sup>, y se ha descrito que esta conformación es relevante pues participa en la mediación de la inhibición tónica en neuronas piramidales de hipocampo[100, 102, 109]. En este trabajo se logró expresar y caracterizar funcionalmente el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 en células HEK293. A través de la elaboración de curvas concentración/respuesta se obtuvo un EC<sub>50</sub>=1.63±0.16  $\mu$ M (Figura 6, Tabla 1), valor coherente a resultados previamente descritos en diversas líneas celulares[100, 102, 110, 111]. De manera similar, a nivel de canal único se obtuvo una amplitud promedio de 1,52±0.71 pA y una conductancia unitaria de 20,57±5,39 pS (Figuras 9 y 10, Tabla 2), valores que también son concordantes con lo reportado en estudios previos[101, 109]. En conjunto, estos resultados son concordantes lo reportado previamente para el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 en HEK293 y representan una contribución para el estudio de este receptor dada su relevancia a nivel extrasináptico.

Se ha descrito que la fosforilación de los GABA<sub>A</sub>Rs tiene como resultado diversos efectos, tanto funcionales como a nivel de expresión en la membrana celular[71]. A nivel funcional, particularmente se ha descrito que la acción de PKA reduce las corrientes activadas por GABA, a nivel de célula completa como a nivel de canal único.[72, 74, 75, 95]. De manera

interesante, se ha descrito que la activación de la vía cAMP/PKA no altera la sensibilidad del receptor, observándose diferentes resultados para las corrientes máximas activadas por GABA[112, 113]. Se expresó una mutante fosfomimética para  $\beta 2$  S410 ( $\beta 2$  S410E) y su control no fosforilable ( $\beta 2$  S410A), los cuales no exhibieron diferencias significativas en sus  $EC_{50}$  y amplitudes máximas de corriente frente al receptor GABAAR  $\alpha 1\beta 2$  WT (Figuras 6 y 7, Tabla 1). Estos resultados son concordantes por lo reportado previamente respecto a la sensibilidad de los GABA<sub>A</sub>Rs, indicando que la introducción de un grupo cargado negativamente en el residuo S410 no altera la afinidad del receptor a GABA.

La presencia de receptores en la superficie celular es un indicador del ensamblaje y competencia de los receptores[114]. Además, se ha observado que la fosforilación de diversas subunidades modula el tráfico y expresión de los GABA<sub>A</sub>Rs a nivel de membrana[12, 68, 73, 76]. Por otra parte, la interacción de los GABA<sub>A</sub>Rs con proteínas de andamiaje como gephyrin y collybistin, proteínas adaptadoras como el complejo AP2, proteínas de adhesión celular como NL-2 y otras proteínas regulatorias como Shisa7 resulta de fundamental relevancia para la presencia de estos receptores a nivel postsináptico[68, 73, 76-78, 115]. El análisis de densidades de corrientes (Figura 8) permitió establecer que no hay diferencias significativas de expresión del receptor en la membrana entre el GABAAR  $\alpha 1\beta 2$  WT y al expresar las mutantes para  $\beta 2$  S410E y S410A. Al respecto, cabe destacar que la mutación S410E no es una fosforilación, sino más bien un reemplazo específico de un grupo químico en un residuo determinado. Por el contrario, la fosforilación puede afectar múltiples sustratos, entre ellos otras subunidades como también diversas proteínas regulatorias asociadas[70, 77, 78]. Esto puede explicar las

discrepancias observadas al estudiar la fosforilación de los GABA<sub>A</sub>Rs en cultivos primarios o en otros sistemas heterólogos. Finalmente, las conclusiones que se pueden inferir acerca de la expresión de membrana de los receptores WT y mutados está restringido por el sistema de transfección transitoria, el cual posee una variabilidad importante en la expresión de proteínas entre células de una misma placa de cultivo. En este sentido, nuestros resultados no pueden descartar que la mutación fosfomimética altere, al menos en parte, la expresión o distribución en membrana plasmática de los GABA<sub>A</sub>Rs. Experimentos futuros que expresen este tipo de mutantes en neuronas podrían contribuir a definir con mayor claridad esta pregunta. Junto a ello, el empleo de microscopia confocal o receptores biotinilados permitirán evaluar cambios de distribución en la membrana con mayor precisión.

El análisis electrofisiológico a nivel de canal único constituye una estrategia complementaria al análisis en célula completa, pues otorga una visión detallada de los eventos microscópicos que ocurren a nivel celular a una resolución de proteína única [101, 116]. Sin embargo, debido a que la superficie celular comprendida es muy pequeña, cabe la posibilidad que uno o pocos canales se encuentren en dicha área. Con esto, es posible registrar las corrientes individuales del receptor. Estos registros permiten conocer información importante como conductancia unitaria, probabilidad de apertura (NPo), y tiempo medio de apertura del canal, las cuales son propiedades específicas de cada combinación de subunidades de receptores. En cuanto a los aspectos técnicos, esta modalidad requiere controlar factores muy sensibles como la resistencia de la pipeta de registro, la calidad y duración del sello, y el control riguroso del ruido. Éste último factor representa un obstáculo al registrar corrientes de baja magnitud como las que exhiben los

GABA<sub>A</sub>Rs. En este sentido, se logró expresar el GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 en HEK293 y como se mencionó anteriormente, sus valores de amplitud de corriente promedio a nivel de canal único y de conductancia unitaria fueron consistentes con lo reportado en estudios anteriores (Figuras 9 y 13, Tabla 2)[101, 109]. Por otra parte, nuestros ensayos no lograron detectar corrientes de canales únicos al expresar la mutante  $\beta$ 2 S410E (Figuras 9,11 y 13, Tabla 2). A su vez, la introducción de un residuo no fosforilable (S410A) permitió observar resultados similares a lo exhibido por el receptor WT (Figuras 9,12 y 13, Tabla 2). Estos resultados se contrastan con lo observado a nivel de célula completa, donde efectivamente se logró registrar amplitudes de corriente para ambas mutantes y además las densidades de corriente no exhibieron diferencias significativas, lo que sugiere que la ausencia de eventos de canales únicos en la mutante fosfomimética no tiene relación con una expresión defectuosa del canal iónico. Sin embargo, se debe mencionar que en célula completa se registra la actividad de la totalidad de los receptores expresados en la superficie, mientras que a nivel de canal único sólo es posible registrar las amplitudes individuales de el/los canales que se encuentren comprendidos dentro del área de la pipeta de registro. Junto a ello, cabe mencionar que no sólo los GABA<sub>A</sub>Rs exhiben valores bajos de conductancia a nivel de canal único, este fenómeno también se ha observado en otros receptores de la familia de los pLGICs, como los 5-HT<sub>3</sub>Rs. La mutación fosfomimética del residuo R436D localizado en el ICD del receptor 5-HT<sub>3</sub>A tiene un gran impacto sobre la conductancia[86, 91, 117]. En conjunto, estos resultados permiten destacar la importancia del residuo S410 localizado en el asa intracelular que une los dominios TM3-TM4 de la subunidad  $\beta$ 2 de los GABA<sub>A</sub>Rs, y sostiene la relevancia de esta

región del ICD en la modulación de la conductancia de los GABA<sub>A</sub>RS y en otros miembros de la familia de los pLGICs como 5-HT<sub>3</sub>Rs, nAChRs y GlyRs[85, 86, 90].

## 6. CONCLUSIONES

A partir de este conjunto de estudios electrofisiológicos en GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 WT y mutados, podemos concluir que la sustitución del residuo S410 de la subunidad  $\beta$ 2 por glutamato (S410E) no posee una influencia significativa sobre las propiedades macroscópicas del receptor, lo cual se refleja en valores de EC<sub>50</sub> para GABA y de densidades de corriente similares entre receptores WT y mutados. Contrariamente, la mutación fosfomimética S410E alteró significativamente la amplitud de la corriente unitaria del canal, la cual no logró ser detectada. Por otra parte, la mutación control no fosforilable (S410A) mostró un perfil similar al receptor WT. En conjunto, los resultados a nivel de canal único sugieren que la conductancia de GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 es, al menos en parte, controlada por la naturaleza química del residuo S410, ya que la introducción de una carga negativa en esta posición del ICD resultó en una disminución significativa de la corriente unitaria del canal, lo que implica una reducción de la conductancia a niveles no detectables. Así, estos datos sugieren que la fosforilación del residuo S410 por PKA o por otras quinasas podría tener un efecto similar en la conductancia de este subtipo de GABA<sub>A</sub>Rs. Futuros estudios funcionales utilizando, por ejemplo, activación química u óptica de PKA en conjunto con mutantes adicionales en otros residuos fosforilables del ICD de la subunidad  $\beta$ 2 lograrán configurar un mapa detallado de los aminoácidos claves para el control de la conductancia de GABA<sub>A</sub>Rs. En un contexto más amplio, los resultados de este trabajo sugieren que la modulación de la conductancia de los PLGICs por fosforilación es un mecanismo conservado entre los receptores inhibitorios de esta familia de receptores.

## 7. REFERENCIAS

1. Lemoine, D., et al., *Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition*. Chem Rev, 2012. **112**(12): p. 6285-318.
2. Li, S., A.H. Wong, and F. Liu, *Ligand-gated ion channel interacting proteins and their role in neuroprotection*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 125.
3. Moss, S.J. and T.G. Smart, *Constructing inhibitory synapses*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(4): p. 240-50.
4. Corringer, P.J., et al., *Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain*. Structure, 2012. **20**(6): p. 941-56.
5. Gielen, M. and P.J. Corringer, *The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization*. J Physiol, 2018. **596**(10): p. 1873-1902.
6. Bormann, J., *Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes*. Trends Neurosci, 1988. **11**(3): p. 112-6.
7. Olsen, R.W. and W. Sieghart, *International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(3): p. 243-60.
8. McKernan, R.M. and P.J. Whiting, *Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?* Trends Neurosci, 1996. **19**(4): p. 139-43.
9. Loup, F., et al., *Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy*. J Neurosci, 2000. **20**(14): p. 5401-19.
10. Mohler, H., *Pathophysiological aspects of diversity in neuronal inhibition: a new benzodiazepine pharmacology*. Dialogues Clin Neurosci, 2002. **4**(3): p. 261-9.
11. Verdoorn, T.A., et al., *Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition*. Neuron, 1990. **4**(6): p. 919-28.
12. Jacob, T.C., S.J. Moss, and R. Jurd, *GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(5): p. 331-43.
13. Rudolph, U. and F. Knoflach, *Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(9): p. 685-97.
14. Laurie, D.J., P.H. Seeburg, and W. Wisden, *The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum*. J Neurosci, 1992. **12**(3): p. 1063-76.
15. Laurie, D.J., W. Wisden, and P.H. Seeburg, *The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development*. J Neurosci, 1992. **12**(11): p. 4151-72.
16. Wisden, W., et al., *The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon*. J Neurosci, 1992. **12**(3): p. 1040-62.
17. Hortnagl, H., et al., *Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain*. Neuroscience, 2013. **236**: p. 345-72.
18. Nusser, Z. and I. Mody, *Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells*. J Neurophysiol, 2002. **87**(5): p. 2624-8.

19. Farrant, M. and Z. Nusser, *Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(3): p. 215-29.
20. Luscher, B., T. Fuchs, and C.L. Kilpatrick, *GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses*. Neuron, 2011. **70**(3): p. 385-409.
21. Chuang, S.H. and D.S. Reddy, *Genetic and Molecular Regulation of Extrasynaptic GABA-A Receptors in the Brain: Therapeutic Insights for Epilepsy*. J Pharmacol Exp Ther, 2018. **364**(2): p. 180-197.
22. Macdonald, R.L., et al., *GABA(A) receptor mutations associated with generalized epilepsies*. Adv Pharmacol, 2006. **54**: p. 147-69.
23. Rissman, R.A., A.L. De Blas, and D.M. Armstrong, *GABA(A) receptors in aging and Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2007. **103**(4): p. 1285-92.
24. Paluszkiwicz, S.M., B.S. Martin, and M.M. Huntsman, *Fragile X syndrome: the GABAergic system and circuit dysfunction*. Dev Neurosci, 2011. **33**(5): p. 349-64.
25. Coghlan, S., et al., *GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms*. Neurosci Biobehav Rev, 2012. **36**(9): p. 2044-55.
26. Simpson, M.D., et al., *Reduced GABA uptake sites in the temporal lobe in schizophrenia*. Neurosci Lett, 1989. **107**(1-3): p. 211-5.
27. Enoch, M.A., *The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism*. Pharmacol Biochem Behav, 2008. **90**(1): p. 95-104.
28. Stephens, D.N., et al., *GABAA receptor subtype involvement in addictive behaviour*. Genes Brain Behav, 2017. **16**(1): p. 149-184.
29. Macdonald, R.L., J.Q. Kang, and M.J. Gallagher, *Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 11): p. 1861-9.
30. Lerma, J., et al., *In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis*. Brain Res, 1986. **384**(1): p. 145-55.
31. Bianchi, M.T. and R.L. Macdonald, *Slow phases of GABA(A) receptor desensitization: structural determinants and possible relevance for synaptic function*. J Physiol, 2002. **544**(Pt 1): p. 3-18.
32. Twyman, R.E., R.M. Green, and R.L. MacDonald, *Kinetics of open channel block by penicillin of single GABAA receptor channels from mouse spinal cord neurones in culture*. J Physiol, 1992. **445**: p. 97-127.
33. Feng, H.J., E.J. Botzolakis, and R.L. Macdonald, *Context-dependent modulation of alphabeta and alphadelta GABA A receptors by penicillin: implications for phasic and tonic inhibition*. Neuropharmacology, 2009. **56**(1): p. 161-73.
34. Twyman, R.E., C.J. Rogers, and R.L. Macdonald, *Pentobarbital and picrotoxin have reciprocal actions on single GABAA receptor channels*. Neurosci Lett, 1989. **96**(1): p. 89-95.
35. Nakahiro, M., et al., *Potentiation of GABA-induced Cl<sup>-</sup> current by a series of n-alcohols disappears at a cutoff point of a longer-chain n-alcohol in rat dorsal root ganglion neurons*. Neurosci Lett, 1996. **205**(2): p. 127-30.
36. Wang, M., *Neurosteroids and GABA-A Receptor Function*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 44.
37. Garcia, P.S., S.E. Kolesky, and A. Jenkins, *General anesthetic actions on GABA(A) receptors*. Curr Neuropharmacol, 2010. **8**(1): p. 2-9.

38. Korpi, E.R. and H. Luddens, *Furosemide interactions with brain GABAA receptors*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(5): p. 741-8.
39. Akk, G., J. Bracamontes, and J.H. Steinbach, *Pregnenolone sulfate block of GABA(A) receptors: mechanism and involvement of a residue in the M2 region of the alpha subunit*. J Physiol, 2001. **532**(Pt 3): p. 673-84.
40. Hosie, A.M., et al., *Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity*. Nat Neurosci, 2003. **6**(4): p. 362-9.
41. Vega Alanis, B.A., et al., *Allosteric GABAA Receptor Modulators-A Review on the Most Recent Heterocyclic Chemotypes and Their Synthetic Accessibility*. Molecules, 2020. **25**(4).
42. Kittler, J.T., et al., *Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons*. J Neurosci, 2000. **20**(21): p. 7972-7.
43. Kittler, J.T., et al., *The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors*. Mol Cell Neurosci, 2001. **18**(1): p. 13-25.
44. Herring, D., et al., *Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 24046-52.
45. Charych, E.I., et al., *The brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2, a protein involved in vesicular trafficking, interacts with the beta subunits of the GABA receptors*. J Neurochem, 2004. **90**(1): p. 173-89.
46. Wang, H., et al., *GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton*. Nature, 1999. **397**(6714): p. 69-72.
47. Kneussel, M. and H. Betz, *Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model*. Trends Neurosci, 2000. **23**(9): p. 429-35.
48. Wang, H. and R.W. Olsen, *Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction*. J Neurochem, 2000. **75**(2): p. 644-55.
49. Keller, C.A., et al., *The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ*. J Neurosci, 2004. **24**(26): p. 5881-91.
50. Bedford, F.K., et al., *GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1*. Nat Neurosci, 2001. **4**(9): p. 908-16.
51. Brandon, N.J., et al., *Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors*. J Neurosci, 2002. **22**(15): p. 6353-61.
52. Brandon, N.J., et al., *A-kinase anchoring protein 79/150 facilitates the phosphorylation of GABA(A) receptors by cAMP-dependent protein kinase via selective interaction with receptor beta subunits*. Mol Cell Neurosci, 2003. **22**(1): p. 87-97.
53. Kanematsu, T., et al., *Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function*. EMBO J, 2002. **21**(5): p. 1004-11.

54. Kanematsu, T., et al., *Phospholipase C-related inactive protein is implicated in the constitutive internalization of GABAA receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex*. J Neurochem, 2007. **101**(4): p. 898-905.
55. Uji, A., et al., *Molecules interacting with PRIP-2, a novel Ins(1,4,5)P3 binding protein type 2: Comparison with PRIP-1*. Life Sci, 2002. **72**(4-5): p. 443-53.
56. Terunuma, M., et al., *GABAA receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein*. J Neurosci, 2004. **24**(32): p. 7074-84.
57. Wang, Q., et al., *Control of synaptic strength, a novel function of Akt*. Neuron, 2003. **38**(6): p. 915-28.
58. Wang, J., et al., *Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor gamma 2 subunits produces long-term depression at CA1 inhibitory synapses*. J Neurosci, 2003. **23**(3): p. 826-36.
59. Moss, S.J., C.A. Doherty, and R.L. Huganir, *Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the beta 1, gamma 2S, and gamma 2L subunits of the gamma-aminobutyric acid type A receptor*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 14470-6.
60. Chapell, R., et al., *Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in Xenopus oocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32595-601.
61. Connolly, C.N., et al., *Cell surface stability of gamma-aminobutyric acid type A receptors. Dependence on protein kinase C activity and subunit composition*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36565-72.
62. Kittler, J.T., et al., *Analysis of GABAA receptor assembly in mammalian cell lines and hippocampal neurons using gamma 2 subunit green fluorescent protein chimeras*. Mol Cell Neurosci, 2000. **16**(4): p. 440-52.
63. Cinar, H. and E.M. Barnes, Jr., *Clathrin-independent endocytosis of GABA(A) receptors in HEK 293 cells*. Biochemistry, 2001. **40**(46): p. 14030-6.
64. Porcher, C., I. Medina, and J.L. Gaiarsa, *Mechanism of BDNF Modulation in GABAergic Synaptic Transmission in Healthy and Disease Brains*. Front Cell Neurosci, 2018. **12**: p. 273.
65. Wan, Q., et al., *Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin*. Nature, 1997. **388**(6643): p. 686-90.
66. Luscher, B. and C.A. Keller, *Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses*. Pharmacol Ther, 2004. **102**(3): p. 195-221.
67. Talwar, S. and J.W. Lynch, *Phosphorylation mediated structural and functional changes in pentameric ligand-gated ion channels: implications for drug discovery*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **53**: p. 218-23.
68. Nakamura, Y., et al., *Phosphorylation on Ser-359 of the alpha2 subunit in GABA type A receptors down-regulates their density at inhibitory synapses*. J Biol Chem, 2020. **295**(35): p. 12330-12342.
69. Kittler, J.T. and S.J. Moss, *Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition*. Curr Opin Neurobiol, 2003. **13**(3): p. 341-7.

70. Vithlani, M., M. Terunuma, and S.J. Moss, *The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(3): p. 1009-22.
71. Brandon, N., J. Jovanovic, and S. Moss, *Multiple roles of protein kinases in the modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor function and cell surface expression*. *Pharmacol Ther*, 2002. **94**(1-2): p. 113-22.
72. Porter, N.M., et al., *Cyclic AMP-dependent protein kinase decreases GABAA receptor current in mouse spinal neurons*. *Neuron*, 1990. **5**(6): p. 789-96.
73. Niwa, F., et al., *cAMP-EPAC-Dependent Regulation of Gephyrin Phosphorylation and GABA(A)R Trapping at Inhibitory Synapses*. *iScience*, 2019. **22**: p. 453-465.
74. Moss, S.J., et al., *Functional modulation of GABAA receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation*. *Science*, 1992. **257**(5070): p. 661-5.
75. McDonald, B.J., et al., *Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase*. *Nat Neurosci*, 1998. **1**(1): p. 23-8.
76. Mukherjee, J., et al., *The residence time of GABA(A)Rs at inhibitory synapses is determined by direct binding of the receptor alpha1 subunit to gephyrin*. *J Neurosci*, 2011. **31**(41): p. 14677-87.
77. Halff, E.F., et al., *Phosphorylation of neuroligin-2 by PKA regulates its cell surface abundance and synaptic stabilization*. *Sci Signal*, 2022. **15**(739): p. eabg2505.
78. Wu, K., et al., *Shisa7 phosphorylation regulates GABAergic transmission and neurodevelopmental behaviors*. *Neuropsychopharmacology*, 2022. **47**(12): p. 2160-2170.
79. Castellano, D., et al., *Shisa7-Dependent Regulation of GABA(A) Receptor Single-Channel Gating Kinetics*. *J Neurosci*, 2022. **42**(47): p. 8758-8766.
80. Nys, M., D. Kesters, and C. Ulens, *Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **86**(8): p. 1042-53.
81. Gamlin, C.R., et al., *Assembly and maintenance of GABAergic and Glycinergic circuits in the mammalian nervous system*. *Neural Dev*, 2018. **13**(1): p. 12.
82. Saiepour, L., et al., *Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(38): p. 29623-31.
83. Kasaragod, V.B. and H. Schindelin, *Structure-Function Relationships of Glycine and GABAA Receptors and Their Interplay With the Scaffolding Protein Gephyrin*. *Front Mol Neurosci*, 2018. **11**: p. 317.
84. Harvey, R.J., et al., *GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization*. *Science*, 2004. **304**(5672): p. 884-7.
85. Moraga-Cid, G., et al., *Modulation of glycine receptor single-channel conductance by intracellular phosphorylation*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 4804.
86. Peters, J.A., et al., *Novel structural determinants of single channel conductance and ion selectivity in 5-hydroxytryptamine type 3 and nicotinic acetylcholine receptors*. *J Physiol*, 2010. **588**(Pt 4): p. 587-96.
87. Keramidas, A., et al., *Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2004. **86**(2): p. 161-204.
88. Jensen, M.L., A. Schousboe, and P.K. Ahring, *Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels*. *J Neurochem*, 2005. **92**(2): p. 217-25.
89. Kelley, S.P., et al., *A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT3 receptors*. *Nature*, 2003. **424**(6946): p. 321-4.

90. Peters, J.A., et al., *The 5-hydroxytryptamine type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor reveals a novel determinant of single-channel conductance*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt3): p. 547-52.
91. Hales, T.G., et al., *Common determinants of single channel conductance within the large cytoplasmic loop of 5-hydroxytryptamine type 3 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(12): p. 8062-71.
92. Carland, J.E., et al., *Characterization of the effects of charged residues in the intracellular loop on ion permeation in alpha1 glycine receptor channels*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(4): p. 2023-30.
93. Everitt, A.B., et al., *Protein interactions involving the gamma2 large cytoplasmic loop of GABA(A) receptors modulate conductance*. *FASEB J*, 2009. **23**(12): p. 4361-9.
94. McDonald, B.J. and S.J. Moss, *Differential phosphorylation of intracellular domains of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits by calcium/calmodulin type 2-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(27): p. 18111-7.
95. McDonald, B.J. and S.J. Moss, *Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA(A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin type II-dependent protein kinase*. *Neuropharmacology*, 1997. **36**(10): p. 1377-85.
96. Macdonald, R.L. and R.W. Olsen, *GABAA receptor channels*. *Annu Rev Neurosci*, 1994. **17**: p. 569-602.
97. Moss, S.J. and T.G. Smart, *Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation*. *Int Rev Neurobiol*, 1996. **39**: p. 1-52.
98. Kapur, J. and R.L. Macdonald, *Cyclic AMP-dependent protein kinase enhances hippocampal dentate granule cell GABAA receptor currents*. *J Neurophysiol*, 1996. **76**(4): p. 2626-34.
99. Raymond, L.A., C.D. Blackstone, and R.L. Huganir, *Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptors in synaptic plasticity*. *Trends Neurosci*, 1993. **16**(4): p. 147-53.
100. Gorrie, G.H., et al., *Assembly of GABAA receptors composed of alpha1 and beta2 subunits in both cultured neurons and fibroblasts*. *J Neurosci*, 1997. **17**(17): p. 6587-96.
101. Lorez, M., et al., *Single-channel properties of neuronal GABAA receptors from mice lacking the 2 subunit*. *J Physiol*, 2000. **527 Pt 1**(Pt 1): p. 11-31.
102. Mortensen, M. and T.G. Smart, *Extrasynaptic alphabeta subunit GABAA receptors on rat hippocampal pyramidal neurons*. *J Physiol*, 2006. **577**(Pt 3): p. 841-56.
103. Jahn, K., et al., *Activation kinetics and single channel properties of recombinant alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptor channels*. *Neuroreport*, 1997. **8**(16): p. 3443-6.
104. Yevenes, G.E., et al., *Molecular determinants for G protein betagamma modulation of ionotropic glycine receptors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(51): p. 39300-7.
105. Kataoka, Y., et al., *GABA receptor function in the parasympathetic ganglia*. *Jpn J Physiol*, 1994. **44 Suppl 2**: p. S125-9.

106. Platzer, D. and K. Zorn-Pauly, *Letter to the editor: Accurate cell capacitance determination from a single voltage step: a reminder to avoid unnecessary pitfalls*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. **311**(4): p. H1072-H1073.
107. Harrison, N.L. and N.A. Lambert, *Modification of GABAA receptor function by an analog of cyclic AMP*. Neurosci Lett, 1989. **105**(1-2): p. 137-42.
108. Nakamura, Y., et al., *Regulation of GABAARs by phosphorylation*. Adv Pharmacol, 2015. **72**: p. 97-146.
109. Moraga-Cid, G., et al., *A Single phenylalanine residue in the main intracellular loop of alpha1 gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors influences their sensitivity to propofol*. Anesthesiology, 2011. **115**(3): p. 464-73.
110. Connolly, C.N., et al., *Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 89-96.
111. Wong, L.W., H.S. Tae, and B.A. Cromer, *Assembly, trafficking and function of alpha1beta2gamma2 GABAA receptors are regulated by N-terminal regions, in a subunit-specific manner*. J Neurochem, 2015. **134**(5): p. 819-32.
112. Heuschneider, G. and R.D. Schwartz, *cAMP and forskolin decrease gamma-aminobutyric acid-gated chloride flux in rat brain synaptoneurosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2938-42.
113. Carlson, S.L., et al., *Ethanol activation of protein kinase A regulates GABAA alpha1 receptor function and trafficking in cultured cerebral cortical neurons*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **345**(2): p. 317-25.
114. Bollan, K., et al., *GABA(A) receptor composition is determined by distinct assembly signals within alpha and beta subunits*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4747-55.
115. Kittler, J.T., et al., *Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14871-6.
116. Mortensen, M. and T.G. Smart, *Single-channel recording of ligand-gated ion channels*. Nat Protoc, 2007. **2**(11): p. 2826-41.
117. Davies, P.A., et al., *The 5-HT3B subunit is a major determinant of serotonin-receptor function*. Nature, 1999. **397**(6717): p. 359-63.