



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR GABA_c ρ 1
EN UN SISTEMA LIBRE DE
CÉLULAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
NEUROBIOLOGÍA**

PRESENTA:

FRANCISCO ERNESTO LÓPEZ SALAS

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
Dra. CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ**



QUERÉTARO, QRO., MARZO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología



Los miembros del jurado de examen de grado certificamos que la tesis elaborada por Francisco Ernesto López Salas, cuyo título es “Expresión del receptor GABA_C rho1 en un sistema libre de células”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de maestría en ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por el reglamento general de estudios de posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. _____

Secretario (tutor)

Dr. _____

Vocal

Dr. _____

Suplente

Dr. _____

Suplente

Dr. _____

Aprobado por el comité académico

Coordinador del programa

Agradecimientos

La realización de este trabajo fue el producto de mi dedicación y constancia durante más de dos años. Durante este tiempo siempre me brindaron su apoyo aquellas personas a quien ahora quiero agradecer sinceramente.

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres. Desde el momento en el que me aceptó en el laboratorio me brindó su amistad, conocimiento y me orientó cada vez que fue necesario.

Al comité tutor: Dr. Manuel Aguilar Ramírez, Dra. Carmen Mejía Vázquez, Dra. Verónica Morales Tlalpan. Siempre estuvieron pendientes de los avances realizados; sus observaciones y correcciones produjeron la mejora continua de este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio D-15 que con su experiencia me dieron el consejo en el momento oportuno: Irma Alicia Martínez, Angélica López, Gustavo Martínez, Argel Estrada, Abraham Rosas, Fernando Rosas, Carlos Martínez, Efrén Ruiz y Joel Vergara.

Quiero agradecer a todos los profesores por sus enseñanzas que me formaron como maestro en ciencias Neurobiológicas. Cada conocimiento adquirido fue una experiencia fascinante que inspira mi curiosidad por las ciencias.

No puedo olvidar lo agradecido que estoy con Dios por permitirme existir y haberme dado lo que tengo; Él siempre me fortalece y guía mis pasos.

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres por haberme dado la oportunidad de estar en su laboratorio Lugar donde pude aprender biología molecular, siempre bajo su constante supervisión y consejo.

A la Dra. Carmen Mejía Vázquez por su apoyo técnico y moral, sus consejos y observaciones me enseñaron a ser más cuidadoso en todo lo que realizo.

A la Dra. Irma Alicia Martínez Dávila por su apoyo técnico siempre adecuado y oportuno. Eres una persona que siempre esta dispuesta a ayudar a todas las personas, gracias por tu apoyo.

Al Biól. Exp. Andrés Falcón Alcántara del Laboratorio de farmacología Marina por su ayuda técnica en los procesos de separación. Gracias por brindarme tu amistad.

Agradezco el apoyo brindado por el personal de la unidad de proteogenómica del Instituto de Neurobiología., personalmente a la Dra. Anaid Antaramian Salas, y a la M. en C. Adriana Gonzáles Gallardo.

Gracias a la M. en C. Leonor Casanova por su orientación y su consejo en la parte escolar y administrativa; es una persona que por su personalidad y carácter siempre dio solución a mis problemas.

Doy constancia del apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Dedicatorias

Dedico esta tesis a mi esposa Liliana Purón por su apoyo incondicional en todas las cosas y momentos difíciles por las que pasamos.

A mis hijas Larissa Estefanía López y Lía María López por todos los ratos por los que paso con ellas; son mi aliciente y el motivo para no descansar y ser el ejemplo para formar de ustedes personas de bien. También se la dedico a mi suegra Raquel Sierra y a mi suegro José Ascensión Purón por el a apoyo que me brindaron al cuidar a mi hija Larissa cuando estábamos en espera de Lía.

A mi madre Maria Guadalupe Salas por sus oraciones que siempre me cuidan.

RESUMEN

La comunicación entre las células nerviosas depende del balance total entre las señales excitadoras e inhibitorias. El ácido γ -aminobutírico (GABA) es una molécula que actúa como un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) adulto, a través de tres tipos diferentes de receptores: GABA_A, GABA_B y GABA_C. GABA_C fue descrito inicialmente en la retina y hoy sabemos que se expresa también en varias regiones del cerebro. Es un canal iónico que se abre por la unión de su ligando permitiendo el paso de iones Cl⁻. Estos canales son considerados proteínas pentaméricas y se conocen tres diferentes subunidades: $\rho 1$, $\rho 2$ y $\rho 3$. Sin embargo, aún no se conoce con precisión su estructura.

El presente trabajo se enfocó en expresar en un sistema libre de células a: 1) la subunidad GABA $\rho 1$ y 2) 259 aminoácidos que corresponde al dominio amino terminal extracelular del mismo. Para su expresión primero se clonó la secuencia nucleotídica que codifica cada proteína en el plásmido de expresión pIVEX 2.3d, fusionando una marca de seis histidinas en el extremo carboxilo y bajo el control transcripcional del promotor T7. El sistema de expresión libre de células consistió en un extracto de *E. coli* con los sustratos y reactivos necesarios para que se realice la transcripción (RNA polimerasa de T7) y traducción de la proteína (tRNA, ribosomas, etc.) de manera acoplada en un ambiente libre de membranas.

La producción de las proteínas se determinó mediante Western blot utilizando dos anticuerpos, uno contra la marca de seis histidinas y otro dirigido a la porción amino del receptor GABA $\rho 1$. Bajo tres diferentes condiciones no fue posible determinar la expresión de GABA $\rho 1$. Sin embargo, el dominio amino terminal de GABA $\rho 1$ sí se expresó eficientemente, lo cual fue revelado por electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot. Además, se purificó este polipéptido utilizando cromatografía de afinidad.

Estos resultados sugieren que el sistema de expresión libre de células permite la expresión de proteínas con carácter hidrofílico, tal como la región amino-terminal de GABA $\rho 1$, pero la síntesis del receptor completo no es posible al menos bajo las condiciones probadas. Es probable que su síntesis se vea inhibida en los residuos transmembranales hidrofóbicos, aunque se requieren más estudios para determinar la limitante para su expresión.

ÍNDICE

Agradecimientos

Dedicatorias

Página

Resumen	i
I. INTRODUCCIÓN	1
El ácido γ -aminobutírico (GABA)	1
Síntesis de GABA	1
Clases de receptores a GABA	2
Diferencias moleculares entre los receptores GABA _A y GABA _C	5
Función y distribución de los receptores GABA _C	5
Diferencias funcionales y farmacológicas entre los receptores GABA _A y GABA _C	7
II. ANTECEDENTES	8
III. HIPÓTESIS	11
IV. OBJETIVOS	11
General	11
Específicos	11
V. MATERIALES Y MÉTODOS	12
Reactivos	12
Soluciones	13
Estrategia general de clonación	13
Transformación bacteriana con el plásmido pcDNA _{3.1} -p1	15
Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina	15
Amplificación del DNAc de GABA _C p1 mediante PCR	15
Separación y purificación del fragmento amplificado por PCR	16
Clonación del fragmento p1 en el plásmido pGEM-T Easy	17
Transformación en bacterias <i>E. coli</i> DH5- α y caracterización del producto de ligación	17
Subclonación del fragmento p1 en los plásmidos pIVEX _{2.3d} y pIVEX _{2.4d}	18

Transformación y caracterización de los vectores plasmídicos pIVEX _{2,3d} ρ1 y pIVEX _{2,4d} ρ1	19
Purificación de los vectores plasmídicos pIVEX _{2,3d} ρ1 y/o pIVEX _{2,4d} ρ1	19
Expresión del fragmento ρ1 en un sistema rápido de traducción (RTS) libre de células	20
Determinación de proteínas por el micrométodo de Lowry	21
Electroforesis	21
Transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa	22
Tinción de geles	22
Inmunodetección	22
Separación del fragmento ρ1NH ₂ mediante electroelución	22
Separación del fragmento ρ1NH ₂ mediante cromatografía de afinidad	23
 VI. RESULTADOS	 24
VII. DISCUSIÓN	38
VIII. CONCLUSIONES	41
IX. PERSPECTIVAS	42
X. REFERENCIAS	43
XI. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	50
XII. LISTA DE ABREVIATURAS	52
XIII. APÉNDICE I	53
XIV. APÉNDICE II	54
XV. APÉNDICE III	55

I. INTRODUCCIÓN

El ácido γ -aminobutírico (GABA)

El ácido γ -aminobutírico (GABA) fue descubierto en el sistema nervioso central (SNC) por Roberts y Frankel en 1950. GABA es un aminoácido no proteico encontrado en organismos procariotes y eucariotes (Helle y col., 1999) y es un neurotransmisor inhibitorio en el cerebro y la retina, esencial para el balance entre la excitación e inhibición neuronal (Chebib y Johnston, 2000). Se conoce que GABA también funciona como un factor neurotrófico esto es, como una molécula señal neurodiferenciadora durante la ontogenia temprana (Meier y col., 1991).

La formación de la sinapsis química en el SNC, es un proceso altamente regulado de múltiples etapas que requiere de la comunicación bidireccional a través de la hendidura sináptica. Es iniciada por la síntesis y liberación del neurotransmisor y la subsiguiente interacción con un receptor específico en la neurona postsináptica y en algunos casos en la neurona presináptica (Helle y col., 1999; Lardi-Studler y Fritschy, 2007).

Síntesis de GABA

La síntesis de GABA en el cerebro tiene lugar en dos compartimentos: en el cuerpo celular y en la terminal nerviosa (Garfinkel, 1996). El L-glutamato es el precursor de la síntesis del GABA, a través de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Westergaard y col., 1995). En las neuronas GABAérgicas se han encontrado dos formas de la enzima: GAD₆₅ que está asociada con la región axonal y GAD₆₇ que se encuentra distribuida más ampliamente (Erlander y col., 1991). GABA existe en al menos dos grupos separados, uno citoplásmico y otro agrupado en vesículas. La distribución celular de las dos isoformas de la enzima GAD, sugiere que la isoforma GAD₆₅ es más importante para la síntesis de GABA destinada al grupo vesicular, mientras que la isoforma GAD₆₇ es primordial para el grupo citoplásmico (Helle y col., 1999).

Clases de receptores a GABA

Los estudios sobre la clasificación de los receptores a GABA comienzan con la observación realizada sobre el alcaloide natural bicuculina, que actúa como antagonista sobre algunos receptores a GABA en la médula espinal (Curtis, 1970). Por otra parte, un análogo a la bicuculina conocido como bacofleno, tiene efectos de agonista sobre otros receptores a GABA en el (SNC); sin embargo, estos efectos no son bloqueados por la bicuculina (Chebib y Johnston, 2000). De esta manera, se descubrió que los receptores a GABA son farmacológicamente heterogéneos y que no todos los receptores son antagonizados por bicuculina.

Los receptores resistentes a bicuculina y activados por bacofleno son clasificados como receptores GABA_B, y los sensibles a bicuculina e insensibles a bacofleno, como receptores GABA_A (Chebib y Johnston, 2000). Los receptores GABA_C también son nombrados receptores no A no B debido a que son insensibles a bicuculina y baclofeno (Polenzani y col 1991, Rabow y col., 1995; McKernan y Whiting, 1996).

GABA influye en las neuronas mediante las tres clases de receptores mencionados: GABA_A, GABA_B y GABA_C que además se distinguen por sus propiedades fisiológicas, farmacológicas y moleculares. GABA_A y GABA_C son canales iónicos que se abren por unión a ligando, mientras que el receptor GABA_B es una proteína de siete pasos transmembranales que se acopla a proteínas G (Chebib y Johnston, 2000).

Los canales iónicos abiertos por unión a ligando, regulan la transmisión sináptica rápida mediante el paso de iones a través del canal que es abierto por unión de un neurotransmisor, como por ejemplo acetilcolina o GABA. Estos receptores son muy diferentes a los receptores acoplados a proteínas G. La familia de canales iónicos abiertos por unión a ligando incluye a los receptores a acetilcolina, a serotonina (5-HT₃), a glicina y los GABA_A y GABA_C. Todos los miembros de esta familia son considerados proteínas compuestas por un pentámero formado por diferentes subunidades, probablemente derivados de un ancestro común. (Le Novère y Changeux, 1999; Ortells y Lunt, 1995). Cada subunidad tiene un dominio N-terminal extracelular, que contiene el sitio de unión del agonista, éste es seguido por tres dominios que atraviesan la

membrana (M1-M3), con un asa intracelular de longitud variable entre los dominios M1 y M2 y un cuarto dominio transmembranal M4 con la parte C-terminal extracelular; entre el M3 y el M4 se forma un asa citoplásmica que es blanco de proteínas cinasas (Figura 1).

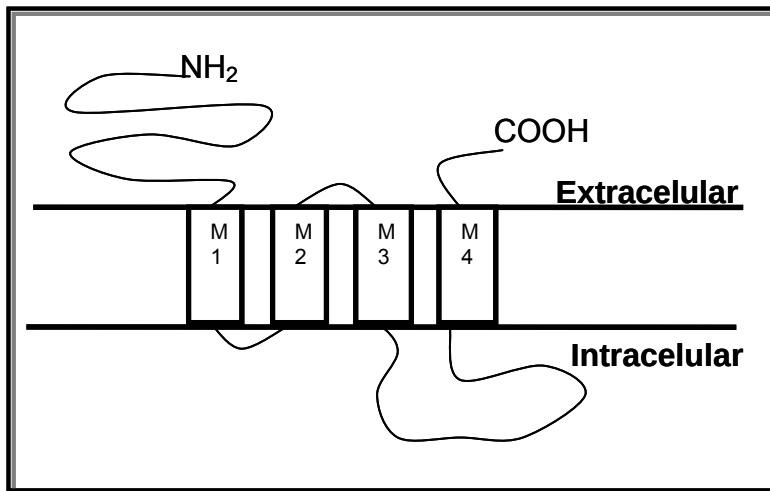


Figura 1. Modelo topológico de una subunidad del receptor GABA_C. M se refiere a cada uno de los segmentos transmembranales.

Cada subunidad se acomoda de tal manera que el dominio M2 forma la pared del poro del canal (Figura 2B), la carga total de este dominio determina si el canal conduce un anión o un catión (Chebib y Johnston, 2000).

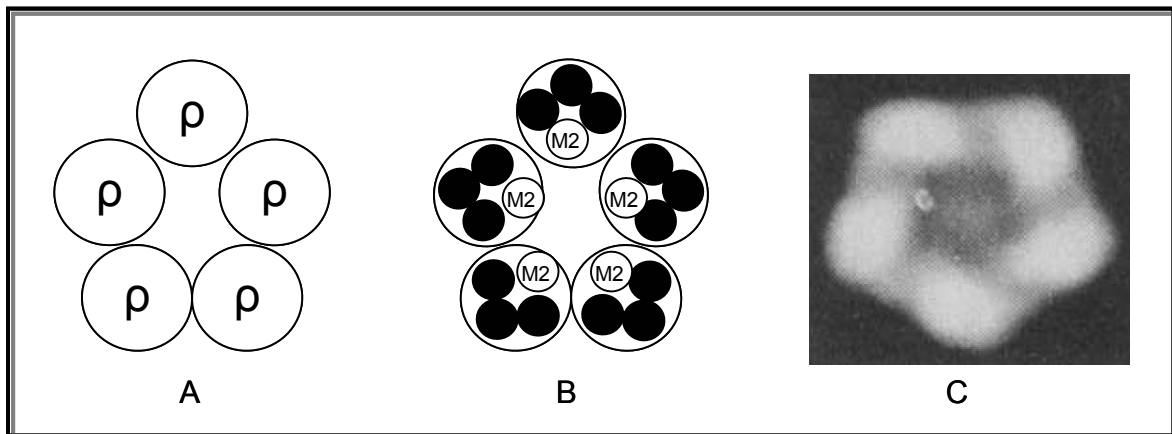


Figura 2. Estructura oligomérica del receptor GABA_C. A) Esquema alusivo del homopentámero formado por las subunidades ρ del receptor GABA_C. B) Representación del dominio M₂ que forma el canal del receptor. C) Micrografía electrónica del receptor GABA_A (Nayeem y col., 1994).

El receptor GABA_B es una proteína de siete pasos transmembranales acoplada a proteínas G que activa segundos mensajeros que a su vez abren canales de K⁺ y Ca²⁺ (Chebib y Johnston, 1999). GABA_B aumenta la señal inhibitoria regulando la liberación de neurotransmisores, la actividad de canales iónicos y la actividad de adenilato ciclasa (Kaupmann y col., 1998). Se conocen tres diferentes subunidades del receptor GABA_B: dos variantes por “splicing”, GABA_BR1a y GABA_BR1b, además la subunidad GABA_BR2 (Kaupmann y col., 1997). Estas subunidades se parecen a los receptores metabotrópicos de glutamato (Kuner y col., 1999). Cuando las subunidades GABA_BR1a o GABA_BR1b se combinan con la subunidad GABA_BR2 y son expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, forman un receptor GABA_B funcional. Estudios de doble inmunoprecipitación han demostrado que la combinación de ambas subunidades también existe *in vivo* (Kaupmann y col., 1997; Kuner y col., 1999). Por consiguiente, GABA_B es un heterodímero compuesto por una subunidad GABA_BR1a o GABA_BR1b y una subunidad GABA_BR2 (Figura 3).

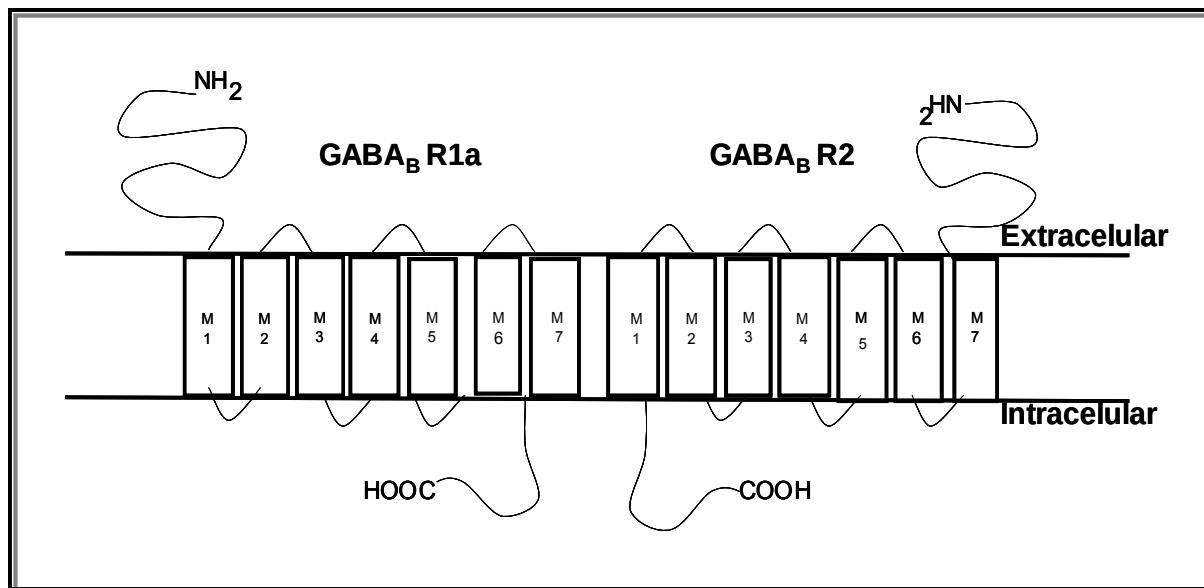


Figura 3. Modelo topológico del heterodímero formado por el receptor GABA_B. M se refiere a cada uno de los segmentos transmembranales.

Diferencias moleculares entre los receptores GABA_A y GABA_C

Los receptores GABA_A y GABA_C son canales iónicos que conducen cloro, y se abren por la unión de GABA causando la inhibición de la neurona. El receptor GABA_A es considerado un receptor heterooligomérico; se han descrito 16 tipos diferentes de subunidades en humanos, clasificados en cinco subfamilias distintas denominadas α (1-6), β (1-4), γ (1-3), δ y ϵ . También se ha descrito otra subunidad nombrada θ (Bonnert y col., 1999); hay aproximadamente 30% de similitud en la secuencia aminoacídica entre cada subfamilia y 70% de similitud entre las subunidades de cada familia.

Por otra parte, GABA_C puede ser considerado como un receptor homooligomérico que está compuesto por subunidades tipo ρ (Figura 2) (Cutting y col., 1991; Enz y Cutting., 1999). En vertebrados se conocen tres diferentes subunidades: $\rho 1$, $\rho 2$ y $\rho 3$. A partir de retina de humano han sido clonadas y caracterizadas dos subunidades: $\rho 1$ con dos variantes por “splicing” y $\rho 2$ (Cutting y col., 1991; Cutting y col., 1992; Martínez-Torres y col., 1998). Estas presentan un 60-70% de similitud en su secuencia aminoacídica (Cutting y col., 1992; Ogurusu y Shingai, 1996; Wang y col., 1994). La subunidad $\rho 3$ fue clonada a partir de una biblioteca de DNAC de retina de rata. El DNAC codifica para 443 aminoácidos, y presenta entre un 61 y 63% de similitud a las secuencias reportadas para las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ de humano respectivamente (Ogurusu y Shangai, 1996). Todas muestran entre un 30-40% de similitud en la secuencia aminoacídica con las subunidades de los receptores GABA_A.

Función y distribución de los receptores GABA_C

Los receptores GABA_C fueron primeramente descritos en ovocitos de *X. laevis* que fueron inyectados con RNAm de retina de bovino (Polenzani y col., 1991). En la retina de mamíferos se expresan en células bipolares y horizontales (Euler y Wassle, 1998; Pan y Lipton 1995; Lukasiewicz y col., 1994); esta localización celular fue confirmada por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (Enz y col., 1996).

Las células bipolares son interneuronas ubicadas entre los fotorreceptores sensoriales y neuronas horizontales en la retina. Forman parte de un circuito que regula la convergencia y la divergencia de información visual preferentemente en la detección de estímulos de baja intensidad de luz. La principal característica de las células bipolares es que forman un sustrato de retroalimentación inhibitoria que permite una regulación de la corriente visual de información, esta función ha sido más ampliamente estudiada en la retina de anfibios (Wu, 1994).

En la terminal axónica de las células bipolares, las células amácrinas GABAérgicas controlan la respuesta de las células bipolares. Estudios de farmacología describen que los receptores GABA_C regulan este mecanismo de retroalimentación (Lukasiewicz y col., 1994). Sin embargo, las terminales de las células bipolares están bajo el control GABAérgico mediante varios receptores ionotrópicos y metabotrópicos. La retroalimentación puede ser diferencialmente activada y depende de la naturaleza del estímulo de luz o del nivel de adaptación de la retina (Wen y Slaughter, 2001).

Nuevos estudios han ubicado una mayor distribución de los receptores en el sistema nervioso, permitiendo sugerir que tienen otras funciones diferentes a las que se les atribuyen en el sistema visual. Estudios de hibridación *in situ* y análisis de RT-PCR demuestran la expresión de las subunidades ρ en la capa gris superficial del colículo superior y en células de Purkinje del cerebelo (Boue-Grabot y col., 1998). Otros estudios describen la localización de las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ en el puente, bulbo, núcleo caudado, hipófisis (López Chávez y col., 2005; Rosas Arellano y col., 2007) y en motoneuronas de la médula espinal (Rozzo y col., 2002).

Se ha demostrado mediante estudios de RT-PCR e inmunohistoquímica que en el estrato piramidal de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo se expresan las tres subunidades ρ de GABA_C (Boue-Grabot y col., 1998; Wegellius y col., 1998; Didelon y col., 2002; Alakuijala y col., 2006).

Diferencias funcionales y farmacológicas entre los receptores GABA_A y GABA_C

Las familias GABA_A y GABA_C pueden distinguirse con base en varias características, tales como el tiempo de apertura, conductancia del canal y la sensibilidad ante diferentes agonistas, antagonistas y moduladores. La Tabla I muestra los principales agonistas, antagonistas y moduladores de los receptores GABA_A y GABA_C; así, como el tiempo medio de apertura y la conductancia del canal.

Tabla I. Algunas características biofísicas y farmacológicas de GABA_A y GABA_C. (Chebib y Johnston, 2000; Johnston y Graham, 2002).

RECEPTOR Tiempo de apertura Conductancia	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	MODULADORES
GABA _A tiempo medio de apertura 25-30 ms conductancia 27-30 pS	Isoguvacina: <u>agonista selectivo</u> . Muscimol: <u>agonista selectivo</u> . Ácido Trans-4-amino-2-metilbital-2-enóico. (2-metil-TACA): <u>agonista selectivo</u> . 3,4,5,6,7-tetrahidroisoxanol(4,5-c)-3-ol. (THIP): <u>agonista parcial</u> . Ácido (4, piperidina-4-sulfónico). (P4S): <u>agonista parcial</u> .	Bicuculina: <u>antagonista selectivo</u> .	benzodiazepinas, barbitúricos y esteroides.
GABA _C tiempo medio de apertura 150-200 ms conductancia 7-8 pS	Ácido (2,1S,2R-2-aminometilciclopropanocarboxílico). (+)- CAMP: <u>agonista selectivo</u> . Ácido cis-4-aminocrotónico. (CACA): <u>agonista parcial</u> . Isoguvacina: <u>agonista parcial</u> .	Ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridina-4)metilfosfónico. (TPMPA): <u>antagonista selectivo</u> .	Zn ²⁺ lantano

Los estudios que intentan definir la estructura de los receptores ionotrópicos tienen un papel importante en el desarrollo de nuevas drogas y para el diseño de nuevos compuestos que actúan selectivamente con un receptor particular nativo o mutado. La diversidad molecular de los canales iónicos abiertos por unión a ligando representa un reto para la química médica en el diseño de agentes terapéuticos específicos a cada subunidad.

II. ANTECEDENTES

Los receptores GABA_A y GABA_C se encuentran formados por diferentes subunidades que presentan una gran homología nucleotídica y aminoacídica (Le Novère y Changeux, 1999). Estas distintas subunidades se organizan formando una diversidad de receptores, que determinan el tipo de ligando que se unirá: agonista, antagonista o modulador (Tabla I). La presencia de algunos de estos fármacos en el SNC modifica la respuesta de una célula regulada por GABA, en función del tipo de receptor que presenta. De esta manera, se han relacionado algunas enfermedades neurológicas con genes específicos de los receptores a GABA; por ejemplo, la enfermedad de Angelman la cual se atribuye a la falta de expresión del gen que codifica para la subunidad $\beta 3$ de GABA_A ocasionando un desorden en el neurodesarrollo presentando retraso mental y epilepsia (DeLorey y Olsen, 1999), o el síndrome de dependencia al alcohol y la psicosis de Korsakoff que se han relacionado con polimorfismos en genes que codifican para las subunidades $\alpha 6$, $\beta 2$ y $\gamma 2$ de GABA_A (Loh y col., 1999; Parsian y Zhang, 1999).

El diseño de fármacos dirigidos a los receptores de GABA se basa en obtener derivados de GABA como agonistas o antagonistas, derivados de benzodiazepinas y barbitúricos como moduladores (Chebib y Johnston 1999). Una forma de obtener moléculas dirigidas a un dominio específico del receptor es el diseñar fármacos basados en la estructura molecular del receptor; actualmente estos estudios se realizan tomando en cuenta la estructura cristalina del receptor a acetilcolina (Chebib y Johnston 1999). El homopentámero formado por GABA_C es un excelente candidato para realizar estudios de modelado molecular y sería de gran relevancia realizar estudios de dinámica molecular considerando la estructura cristalina de GABA_C.

A pesar de la importancia que tienen los diferentes tipos de receptores a GABA, aún no ha sido determinada la estructura tridimensional de la proteína. Esto se debe principalmente a la gran dificultad para obtener proteínas integrales de membrana con rendimiento mayor a un miligramo y con un alto grado de pureza. La expresión de un gen en un sistema de células vivas, a menudo está sujeta a una serie de limitaciones; los productos polipeptídicos producidos en una célula pueden ser inestables y en algunos casos son tóxicos para la célula (Spirin y col., 1988). Los sistemas tradicionalmente utilizados para la expresión de proteínas consisten en transformar o transfectar con un vector, que contiene clonado el gen que codifica para la proteína de interés, a células

procariotas, como *Escherichia coli*, o a células eucariotas como levaduras o células de insecto. Sin embargo, el rendimiento obtenido es muy limitado. Por ejemplo, se ha intentado sobreproducir y purificar la subunidad $\rho 1$ de GABA_C en *Saccharomyces cerevisiae* (Martínez-Martínez y col., 2003).

La obtención de grandes cantidades de proteína con alta pureza es muy importante para estudios estructurales. La sobreproducción de proteínas de membrana es difícil debido a que están inmersas en un ambiente lipídico, lo que dificulta su solubilidad (Berrier y col., 2004). La síntesis de proteínas mediante un sistema de transcripción y traducción rápida (RTS) libre de células, en ausencia de una membrana pero en presencia de detergentes, es una alternativa para obtener mejores rendimientos de la proteína, ya que la traducción de la proteína puede ser posible durante un tiempo prolongado sin la presencia de productos tóxicos de reacción. Sin embargo, esto implica que la proteína debe de ser capaz de plegarse en ausencia de un mecanismo de inserción a la membrana. Por ejemplo, experimentos realizados con Bacteriorrodopsina y diacilglicerol cinasa, indican que una proteína de membrana con α -hélices puede ser desnaturalizada y volverse a plegar después de ser transferida a un detergente o a un lípido (Booth., 2003). Otra evidencia de la versatilidad del RTS la representa la expresión del canal mecanosensitivo MscL de *E. coli*, el cual se purificó y reensambló en presencia de detergentes, generando un canal mecanosensible funcional (Park y col., 2004).

Una de las ventajas que ofrece la expresión de proteínas libre de células, es que al ser un sistema abierto permite manipular las condiciones de reacción, lo que llevaría a una mayor producción y al correcto plegamiento de la proteína. Otras ventajas son: a) que se pueden alterar los niveles de RNA de transferencia, de tal manera que se dirige el uso de codones del gen de interés (Jiang y col., 2001), b) se puede realizar la purificación en una sola etapa si se fusionan mediante ingeniería genética “etiquetas” que permitan la cromatografía de afinidad (Alimov y col., 2000; Lamla y col., 2002) y c) se pueden incorporar aminoácidos marcados isotópicamente en una proteína (Kigawa y col., 1999, 2002; Noren y col., 1989).

El sistema de expresión libre de células que se utiliza es un kit comercial desarrollado por la compañía Roche (No catálogo: 04 471 954 001). Consiste en un lisado de *E. coli* que contiene

los componentes necesarios para conducir la transcripción y la traducción simultánea en un recipiente de reacción en presencia de un molde de DNA, siguiendo el principio descrito por Spirin (Spirin y col., 1988). En éste, una membrana semipermeable permite el continuo intercambio de sustancias necesarias para la síntesis de proteínas y remueve los productos que causan la inhibición de la reacción; de esta forma se prolonga el tiempo que dura la expresión y producción de la proteína.

Una alternativa para conocer la estructura parcial de proteínas de membrana de células eucariotes, es expresar fragmentos de éstas. Por ejemplo, un fragmento de 130 aminoácidos del extremo amino de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A fue sobreproducida en *E. coli* para hacer estudios de microscopía electrónica de transmisión donde se observó la formación de oligómeros (Xue y col., 2000). Por otra parte, la proteína de unión de acetilcolina (AChBP) es una proteína soluble encontrada en el caracol *Limnaea stagnalis*. Esta es producida y liberada en el espacio intersináptico donde modula la transmisión sináptica de manera dependiente de acetilcolina. Está formada por un homopentámero de 210 residuos que presenta homología con la secuencia amino terminal extracelular de los receptores nicotínicos y GABA. Recientemente fue descrita la estructura cristalina de AChBP con una resolución de 1.96-3.0 °Å (Katjusa y col., 2001; Hansen y col., 2005), por lo que se ha sugerido como un modelo estructural para el extremo amino de la familia de receptores ionotrópicos como lo son GABA_A, GABA_C, receptor a Glicina, etc.

En este proyecto se planteó producir la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C sin el péptido señal mediante un sistema de traducción rápida (RTS) libre de células. Como alternativa también se decidió expresar un fragmento de 259 aminoácidos que conforman el extremo amino del receptor sin el péptido señal utilizando este mismo sistema de expresión.

III. HIPÓTESIS

La expresión de la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C *in vitro* en un sistema libre de células permite obtener mejores rendimientos que los sistemas *in vivo*.

IV. OBJETIVOS

General

Expresar receptores funcionales GABA_C - $\rho 1$ en un sistema libre de células.

Particulares

1. Mutación dirigida por PCR y clonación en el plásmido pGEM-T easy.
2. Subclonación de $\rho 1$ en los plásmidos de expresión pIVEX_{2.3d} y pIVEX_{2.4d}.
3. Expresión de $\rho 1$ en un sistema libre de células (RTS).
4. Purificación de la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C

V. MATERIALES Y METODOS

Reactivos. Los reactivos del sistema rápido de traducción (RTS) 100 (kit de *E. coli* HY, No. cat. 3186 148 y RTS 100 y kit de *E. coli* de disulfuro, No Cat. 04 349 741 001) utilizados durante la expresión se muestran en la Tabla II (Roche Inc.). En la detección del fragmento NH₂ de la subunidad p1 del receptor a GABA_C se empleó un anticuerpo policlonal específico que reconoce el epítipo His 6x y un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina que reconoce al primero, adquiridos de Affinity Bioreagents y Santa Cruz Biotechnology respectivamente. Los estándares de peso molecular y las enzimas *Eco* R1 y *Nco*1 así como el fago λ y la enzima *Pst*1, se adquirieron de Invitrogen. La enzima *Xma*1, se adquirió de New England Biolabs. La acrilamida y la leche descremada grado Western blotting, se adquirieron de Bio-Rad. El medio de cultivo para bacterias Luria Bertani (LB) y los reactivos BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) utilizados como sustratos de la fosfatasa alcalina, se adquirieron de Sigma. Los demás reactivos se adquirieron de JT Baker.

Tabla II. Principales componentes del sistema de traducción rápido libre de células.

Componentes	Expresión procariote
Ribosoma	70S
tRNAs	
tRNA Iniciador	tRNA
20 ARS _s individuales	
Factores de iniciación	IF ^s : 1,2,3
Factores de elongación	EF-Tu, EF-Ts, EF-G
Factores de terminación	RF, RF2, RF3, RRF
Aminoácidos	Todos los 20
ATP y GTP	+
Mg ²⁺	8-15 mM
K ⁺ y/o NH ₄ ⁺	100-250mM
Disulfuro isomerasa	Sistema redox para la formación de enlaces disulfuro
GroE	Chaperona que permite mayor cantidad de proteína soluble
Otros componentes	Inhibidores de proteasas, inhibidores de RNAasa y NaN ₃
Amortiguadores	Para mantener pH 7,4-8

Soluciones. Durante la extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina, se utilizaron las siguientes soluciones: Solución **I** (Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM). Solución **II** (NaOH 0.2 N, SDS 1% (w/v)). Solución **III** (Acetato de potasio 5 M al 60%, ácido acético glacial 11.5%). Durante la purificación del DNA plasmídico mediante el kit Qiagen, se utilizaron las siguientes soluciones: Solución **P1** (Tris Cl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNAasa A 100 µg/mL). Solución **P2** (NaOH 200 mM, SDS 1%). Solución **P3** (Acetato de potasio 3.0 M pH 5.5). Solución **QBT** (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM pH 7.0, Isopropanol 15%, Triton X-100 0.15%). Solución **QC** (NaCl 1.0 M, MOPS 50 mM pH 7.0, Isopropanol 15%). Solución **QF** (NaCl 1.25 M, Tris Cl 50 mM pH 8.5, isopropanol 15%). La incubación con anticuerpos se llevó a cabo en TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%). Las muestras de DNA para su separación se prepararon en la solución (azul de bromofenol 0.25% w/v, xileno cianol 0.25% w/v y glicerol en H₂O 30% v/v). Las muestras de proteína para su separación, se prepararon en condiciones desnaturalizantes en la solución (Tris-Cl 50 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.2% w/v, SDS -grado electroforesis- 2%, glicerol 10% v/v y β-mercaptoetanol 10%).

Estrategia general de clonación. Inicialmente se introdujo en los plásmidos de expresión pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d} el DNAC de ρ1, cuya secuencia nucleotídica codifica 458 aminoácidos, sin incluir el péptido señal de ρ1. Como alternativa se siguió una segunda estrategia en la cual se introdujo en el plásmido pIVEX_{2,3d} el fragmento ρ1NH₂ que codifica 259 aminoácidos que conforman el extremo amino terminal sin el péptido señal hasta el inicio del primer segmento transmembranal de la subunidad ρ1 del receptor GABA_C. En la Figura 4 se muestra la estrategia general de clonación. En primera instancia se amplificaron estos fragmentos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del plásmido pcDNA_{3.1}-ρ1 (Martínez-Torres y col., 1998) introduciendo sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Nco*I y *Xma*I. Los fragmentos amplificados fueron aislados y clonados en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) y de aquí subclonados en los plásmidos de expresión pIVEX_{2,3d} y/o pIVEX_{2,4d} utilizando los sitios *Nco*I y *Xma*I, permitiendo introducir en la fase de lectura adecuada y en fusión con la marca His 6X que se utiliza como epítipo durante la detección mediante un anticuerpo específico.

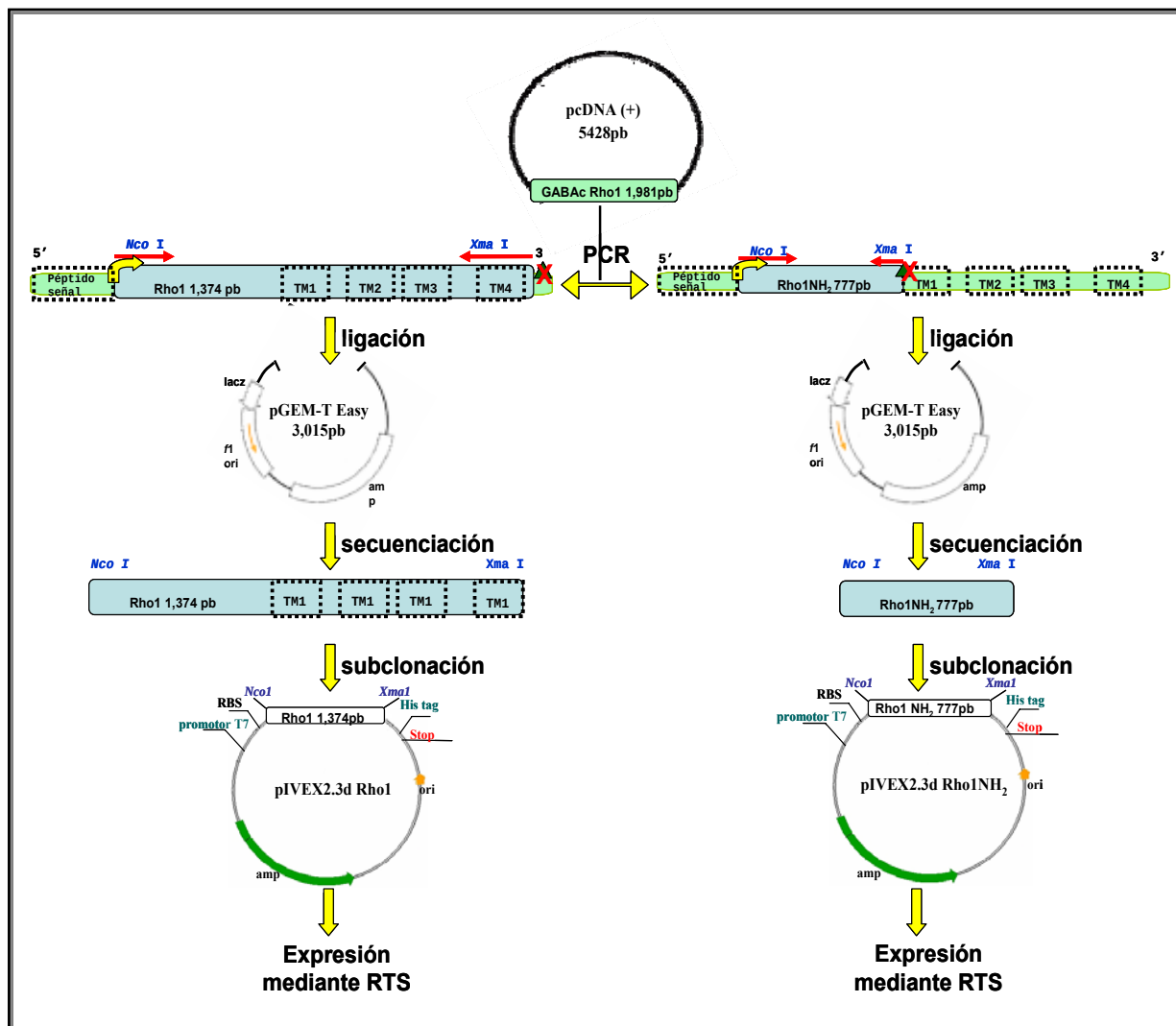


Figura 4. Estrategia general de clonación de los fragmentos $\rho 1$ y $\rho 1NH_2$ en los plásmidos de expresión pIVEX_{2.3d} y/o pIVEX_{2.4d} a partir del plásmido pcDNA_{3.1}- $\rho 1$ (Martínez-Torres y col. 1998)

Transformación bacteriana a partir del plásmido pcDNA_{3.1}-p1. Se transformaron 50 µL de bacterias *E. coli* XL1 blue en estado competente con 100 ng del plásmido pcDNA_{3.1}-p1 (Martínez-Torres y col., 1998). Se colocaron las bacterias en hielo durante 30 min y se dió un choque térmico a 42°C durante 3 min. Posteriormente se pusieron en hielo durante 2 min y después, se colocaron en 1 mL de medio LB incubándolas durante 1 hora a 37°C. Se concentraron las bacterias por centrifugación a 8,648 g durante 1 min y se suspendieron en 200µL del mismo medio, mismos que se distribuyeron en una placa de agar LB con ampicilina [100 µg/mL]. Las placas se incubaron durante 15 horas a 37°C.

Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina. Se seleccionaron de las placas de cultivo aquellas colonias de bacterias que crecieron después de ser transformadas. Se propagaron en 4 mL de medio LB con ampicilina [100 µg/mL], incubándolas durante 17 horas a 37°C a 280 rpm. Concluido el tiempo de incubación, se recolectaron las bacterias por centrifugación a 8,648 g durante 3 min a 4°C. Posteriormente, se suspendieron en 200 µL de la solución I (Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM), se adicionaron 200 µL de la solución II de lisis alcalina (NaOH 0.2 N, SDS 1%). La mezcla se neutralizó adicionando 300 µL de la solución III (acetato de potasio 5 M al 60%, ácido acético glacial 11.5%). Los restos celulares de la reacción de lisis se precipitaron a 12,354 g durante 5 min a 4°C, y el sobrenadante se colocó en un tubo Eppendorf nuevo al que se le agregó un volumen igual de fenol saturado con agua. Se homogenizó la mezcla y se centrifugó a 12,354 g durante 10 min a 4°C; la fase acuosa se separó en un tubo nuevo y se añadieron 2.5 volúmenes de etanol frío al 100%, se incubó en hielo para favorecer la precipitación del DNA plasmídico y después se centrifugó a 12,354 g durante 10 min a 4 °C. El DNA se lavó con etanol al 70% centrifugando a 12,354 g durante 10 min a 4°C. Se desechó el etanol y se dejó secar, después se resuspendió en 20 µL de H₂O MQ esterilizada y se almacenaron a -20°C.

Amplificación del DNAC de GABA_C p1 mediante PCR. Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar fragmento que codifica p1 sin el péptido señal, según la secuencia publicada del gen GABA_C p1 y además se introdujeron los sitios de restricción *Nco*1 y *Xma*1 en los extremos 5' y 3' respectivamente. La Tabla III muestra la secuencia de cada uno de los “primers”.

Tabla III. Secuencia nucleotídica de los “primers” sentido y antisentido utilizados para generar el DNAC de la subunidad p1 del receptor a GABA_C.

Nombre del primer		Secuencia de los primers
Sentido	p1 5' <i>Nco</i> I	5'- CCATGG CTGAAAGCAGAATGCACTGGCCCCGA-3'
Antisentido	p1 3' <i>Xma</i> I	5'- CCCGGGG GAGAAAATAGACCAGTATATTAA-3'

Se prepararon dos mezclas para la reacción en cadena de la polimerasa, según se muestra en la Tabla IV. Una para amplificar p1 y el otro como control que consiste en todos los reactivos, excepto que no contiene el molde de DNA.

Tabla IV. Reactivos utilizados en la mezcla de una reacción de PCR y condiciones en que se realizó la reacción de PCR.

Reactivos	Volumen µl	Concentración
Molde de DNA	2	10 ng/µL
Amortiguador Taq 10x	5	1X
Mg Cl ₂ 50 mM	3.5	3.5 mM
dNTPs 10 µM	1	0.2 µM
Primer sentido 2.5 µM	4	0.2 µM
Primer Antisentido 2.5 µM	4	0.2 µM
Taq polimerasa 1 U/µL	1	0.02 U
H ₂ O MQ	30	
	V _f = 50	

94°C 2 min
 30 ciclos { 94°C 1 min
 60°C 1 min
 72°C 1 min
 72°C 5 min
 4°C

Separación y purificación del fragmento amplificado por PCR. El fragmento p1 obtenido por PCR se separó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL), se cortó y se pesó. Para la purificación se utilizó el kit de extracción de DNA en gel QIAGEN, mediante el siguiente procedimiento. Se añadieron 3 volúmenes (peso del gel-volumen de solución) de la solución **QG** y se incubaron a 50°C hasta que se disolvió el gel, se homogenizó la mezcla y se pasó por una columna de separación centrifugando a 16,060 g durante 1 min. Una vez retenido el DNA en la columna, se lavó adicionando 750 µL de la solución **PE** centrifugando a 16,060 g durante 1 min. El DNA se eluyó en 30 µL de H₂O MQ por centrifugación a 16,060 g durante 1 min y se almacenó a -20°C. El DNA ya purificado se utilizó para ligarlo en el plásmido pGEM-T Easy.

Clonación del fragmento p1 en el plásmido pGEM-T Easy (Figura 5). Se utilizaron alícuotas de 50 ng/μL del plásmido pGEM-T Easy (Promega) almacenados a -20°C para cada una de las reacciones de ligación que se prepararon según se muestra en la Tabla V.

Tabla V. Reactivos utilizados para una reacción de ligación en el plásmido pGEM-T Easy.

Reactivos	Volumen μl
Amortiguador de ligación 2x	10
Plásmido (50ng/μL)	0.5
Fragmento p1 (50ng/μL)	8.5
T4 DNA ligasa 1U/μL	1
	Vf=20

Una vez preparada la mezcla de reactivos, se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 14-16 h, después se tomó una alícuota (5 μL) para hacer una transformación en bacterias *E. coli* DH5-α, el resto se guardó a -20°C.

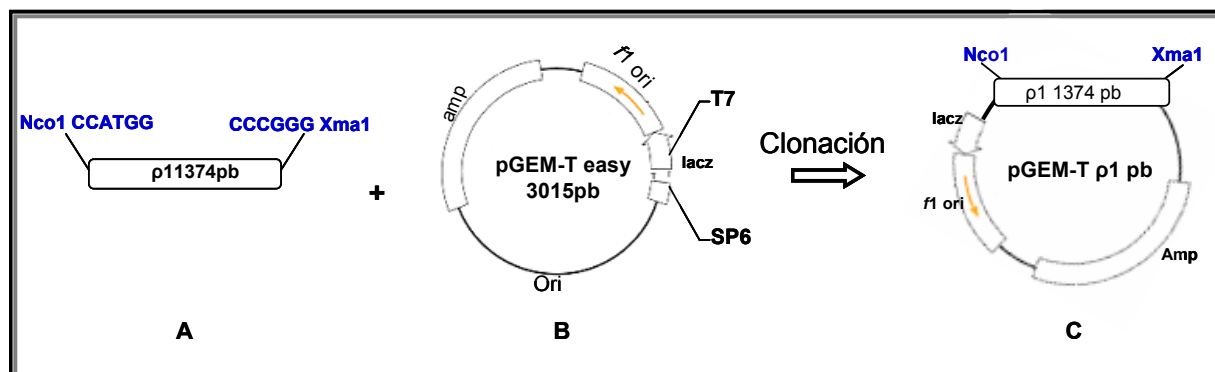


Figura 5. Estrategia para la clonación de p1 en el plásmido pGEM-T Easy. (A) El fragmento p1 amplificado por PCR se clonó en (B) plásmido pGEM-T Easy. Obteniéndose como producto la construcción pGEM-T p1 (C).

Transformación en bacterias *E. coli* DH5-α y caracterización del producto de ligación. Se transformaron 50 μL de *E. coli* DH5-α con 5 μL de la reacción de ligación del fragmento p1 en el plásmido pGEM-T Easy, se colocaron en hielo durante 30 min y se dió un choque térmico a 42°C durante 3 min. Posteriormente se pusieron en hielo durante 2 min. Después, las bacterias se colocaron en 1 mL de medio LB incubándolas durante 2 h a 37°C. Las bacterias se concentraron por centrifugación a 8,648 g durante 1 min y se suspendieron en 200 μL del mismo medio, éstos se colocaron en una placa de agar LB con ampicilina (100 μg/mL), con

50 μ L de X-gal al 2% y 20 μ L de Isopropil- β -tiogalactósido (IPTG) al 0.1 M, distribuyendo homogéneamente por toda la placa. Posteriormente, las placas se incubaron durante 15 h a 37°C y una 1 h más a 4°C, tiempo necesario para distinguir entre colonias blancas y azules (que no tienen el inserto). Se seleccionaron aquellas colonias blancas que probablemente llevan el inserto, y se propagaron en 4 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL). Después se extrajo el DNA plasmídico por lisis alcalina siguiendo el procedimiento previamente descrito, y se caracterizó cada una de las colonias mediante digestión enzimática con *Eco*R1. Se secuenciaron aquellas muestras de DNA plasmídico que fueron positivas al fragmento ρ 1.

Subclonación del fragmento ρ 1 en los plásmidos pIVEX_{2.3d} y pIVEX_{2.4d}. Se transformaron bacterias *E. coli* XL1 blue en estado competente con los plásmidos pIVEX_{2.3d} y pIVEX_{2.4d}, se propagaron las colonias y se extrajo el DNA plasmídico por lisis alcalina según los métodos previamente descritos. Después se realizó una doble digestión enzimática, con las enzimas de restricción *Nco*1 y *Xma*1, del plásmido pGEM.T ρ 1, quedando separado el fragmento ρ 1 del resto del vector. Además, se realizó una doble digestión de los plásmidos pIVEX_{2.3d} y pIVEX_{2.4d} con las mismas enzimas de restricción, quedando los plásmidos abiertos (Figura 6). Las condiciones de la mezcla de reacción se muestran en la tabla VIA.

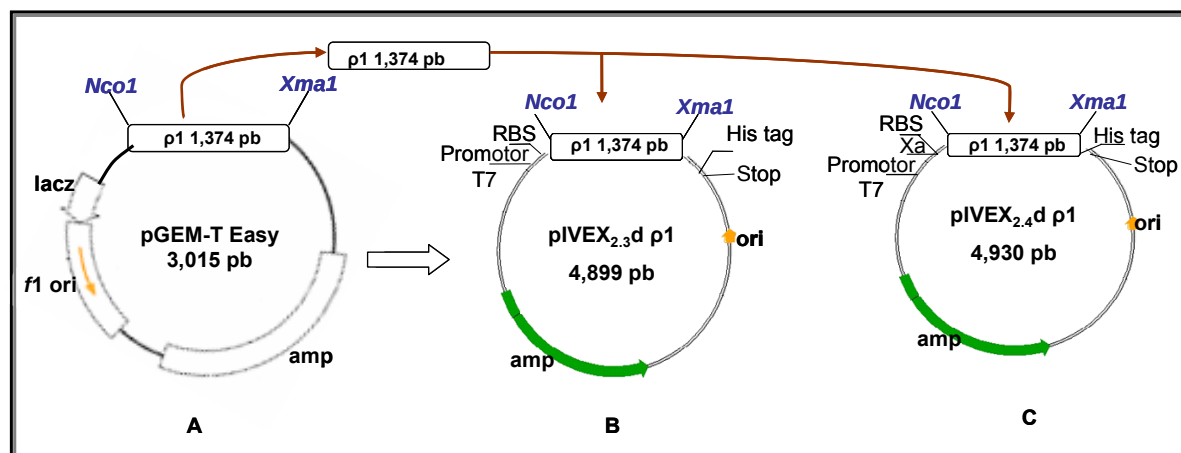


Figura 6. Subclonación dirigida de ρ 1 en los plásmidos pIVEX_{2.3d} y pIVEX_{2.4d}. (A) La doble digestión de la construcción pGEM-T ρ 1 con las enzimas *Nco*1 y *Xma*1 produce la liberación del fragmento ρ 1. (B) La doble digestión con las mismas enzimas cortan los plásmidos pIVEX_{2.3d} y pIVEX_{2.4d}. (C) El producto de la clonación del fragmento ρ 1 en el plásmido abierto pIVEX_{2.3d} y pIVEX_{2.4d} da como resultado las construcciones pIVEX_{2.3d} ρ 1 y pIVEX_{2.4d} ρ 1.

Las reacciones de digestión de la construcción pGEM-T $\rho 1$ y de los plásmidos pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d} se incubaron durante 1 h 30 min a 37°C, después se separaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL) al 1%. El fragmento $\rho 1$ separado y los plásmidos pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d} abiertos, se purificaron utilizando el kit para extracción de DNA en gel QIAquick siguiendo el procedimiento ya descrito. Después, se clonó el fragmento $\rho 1$ en los plásmidos pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d}, se utilizó una relación molar de 6 a 1 de la cantidad de inserto con respecto al plásmido en la mezcla de reacción que se muestra en la tabla VIB. La reacción de ligación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 14-16 h, después se guardó a -20°C.

Tabla VI. (A) Reactivos utilizados para la reacción de doble digestión con las enzimas *Nco*1 y *Xma*1. (B) Reactivos utilizados durante la ligación del fragmento $\rho 1$ en los plásmidos pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d}.

A

Reactivos	Volumen μ l
DNA plasmídico 0.5 μ g/ μ L	20
Amortiguador invitrogen 4 10x	3
<i>Nco</i> 1 10 U/ μ L	2
<i>Xma</i> 1 10 U/ μ L	2
H ₂ O MQ estéril	3
	Vf= 30

B

Reactivos	Volumen μ l
Plásmido abierto (200 ng)	2
Inserto NH ₂ (1.2 μ g)	12
Amortiguador T4 ligasa 5X	4
T4 DNA ligasa 1 U/ μ l	2
	Vf= 20

Transformación y caracterización de los vectores plasmídicos pIVEX_{2,3d} $\rho 1$ y pIVEX_{2,4d} $\rho 1$. Se transformaron 50 μ L de bacterias *E. coli* XL1 blue, con las construcciones pIVEX_{2,3d} $\rho 1$ y pIVEX_{2,4d} $\rho 1$, siguiendo el procedimiento antes descrito. Se propagaron las colonias que crecieron en 4 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se extrajo DNA plasmídico mediante lisis alcalina. La caracterización de cada uno de los plásmidos se realizó primeramente mediante una digestión enzimática con las enzimas *Eco* R1 y *Hind*III, después se caracterizó por secuenciación. La reacción de digestión enzimática se llevó a cabo durante 1 h a 37°C y se prepararon 4 μ L del DNA digerido en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se analizó el tamaño de cada fragmento.

Purificación de los vector plasmídico pIVEX_{2,3d} $\rho 1$ y/o pIVEX_{2,4d} $\rho 1$. Se propagaron bacterias *E. coli* XL1 blue que portan el plásmido pIVEX_{2,3d} $\rho 1$, en 50 mL de medio LB con ampicilina [100 μ g/mL], durante 16 h a 37°C en agitación y se extrajo el DNA plasmídico

utilizando el kit de purificación de DNA Qiagen. Para ello, primero se colectaron las bacterias por centrifugación a 8,648 g durante 3 min y se les adicionó 4 mL de la solución **P1** (Tris HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNAasa A 100 µg/mL), después se adicionó 4 mL de la solución **P2** (NaOH 200 mM, SDS 1% (w/v)). Solución **P3** (Acetato de potasio 3.0 M pH 5.5), la mezcla se agitó por inversión y se incubó en hielo durante 5 min se adicionaron 4 mL de la solución **P3** (acetato de potasio 3.0 M pH 5.5) y se colocó en hielo durante 20 min. Los restos celulares se precipitaron por centrifugación a 12,354 g durante 10 min a 4°C. Por otra parte, la columna de separación se equilibró haciendo pasar por fuerza de gravedad 4 mL de la solución **QBT** (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM pH 7.0, isopropanol 15%, Triton X-100 0.15%), se atrapó el DNA plasmídico en la columna haciendo pasar el sobrenadante de la reacción de lisis. Después se realizaron 2 lavados con 10 mL de la solución **QC** (NaCl 1.0 M, MOPS 50 mM pH 7.0, isopropanol 15%). El DNA plasmídico se eluyó de la columna con 5 mL de la solución **QF** (NaCl 1.25 M, Tris HCl 50 mM pH 8.5, isopropanol 15%). Posteriormente se adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol frío y se precipitó centrifugando durante 10 min a 12,345 g a 4°C, se lavó con etanol al 70% y por último se suspendió el DNA en 60 µL de H₂O DEPC. Se guardaron las muestras a -20°C.

Expresión del fragmento p1 en un sistema rápido de traducción (RTS) libre de células. Las construcciones pIVEX_{2,3d} p1 y pIVEX_{2,4d} p1 se utilizaron como molde para realizar la transcripción y la traducción acoplada de p1 en un sistema de traducción libre de células desarrollado por Roche. Se preparó la mezcla de reacción para cada una de las reacciones según se muestra en la Tabla VII. La reacción se llevó a cabo en el instrumento RTS Proteo Master (Roche) durante 24 h a 30 °C y 600 rpm, concluido el tiempo de reacción, se incubó durante 12 h a 4°C y después se almacenó a -70°C.

Tabla VII. Mezcla de los reactivos para la reacción de RTS.

Cámara de reacción		Cámara de intercambio	
Reactivos	Volumen µl	Reactivos	Volumen µl
Lisado <i>E.coli</i> activado	25		
Mezcla de reacción	7	Mezcla de reacción	640
Aminoácidos	7	Aminoácidos	140
Metionina	1	Metionina	20
Suplementos o agua grado PCR	5	Suplementos o agua grado PCR	200
Molde de DNA	1.5 µg en 5 µL		

Determinación de proteínas por el micrométodo de Lowry. El método empleado se basó en la reacción descrita por Lowry y col. (1951). Alícuotas de 2 µL del homogenado celular se incubaron con 2 µL de NaOH 0.1 M a temperatura ambiente 2 h, se aforaron a 20 µL con agua desionizada y se le añadieron 100 µL de solución de NaCO₃ al 2% (preparada en NaOH 0.1 M) se le adicionaron 10 µL de CuSO₄ al 4% en agua y 10 µL de tartrato de sodio y potasio al 2.5% en agua. Se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se añadieron 20 µL de reactivo de Folin diluido 1:1 en agua desionizada con agitación constante. Después de incubar durante 30 min a temperatura ambiente se leyó su absorbencia en un espectrofotómetro a 680 nm. La concentración de proteína se determinó de acuerdo a una curva estándar de calibración utilizando concentraciones conocidas de una solución de albúmina sérica de bovino desde 200 µg/mL hasta 10 µg/mL.

Electroforesis. Se colocaron 4 µL del producto de la reacción de RTS en un gel de poliacrilamida-SDS al 12.0% para separar las proteínas según el método de Laemmli (1970). Las muestras se diluyeron 1:1 con “buffer” de carga (Tri-HCl 50 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.2% w/v, SDS -grado electroforesis- 2%, glicerol 10% v/v y β-mercaptoetanol 10%) y se incubaron durante 5 min a 96 °C. Los minigeles se prepararon al 12.0% en placas de vidrio de 10 cm x 12 cm separadas 1.0 mm en un equipo vertical Hoeffer, como se muestra a continuación:

<u>Gel separador (1.0 mm)</u>	<u>12%</u>	<u>Gel concentrador (1.0 mm)</u>	<u>5%</u>
Acrilamida 29%- bisacrilamida 1%	4.0 mL	Acrilamida 29 %- bisacrilamida 1%	0.83 mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.50 mL	Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.63 mL
Agua desionizada	3.3 0 mL	Agua desionizada	3.40 mL
SDS 10%	0.10 mL	SDS 10%	0.05 mL
Persulfato de amonio 10%	0.10 mL	Persulfato de amonio 10%	0.05 mL
TEMED	0.004 mL	TEMED	0.005 mL

Una vez polimerizado y montado el gel en la cámara, ésta se llenó con “buffer” de corrida 1X (Tris–HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%) y las muestras se colocaron en los pozos. Se aplicó un voltaje de 80 mV para llevar a cabo la electroforesis de las proteínas en el gel concentrador y 200 mV en el gel separador.

Transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. Concluida la electroforesis, el gel se colocó en un papel filtro humedecido en la solución para transferencia (Tris–HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) y sobre él la membrana de nitrocelulosa

previamente humedecida en la misma solución procurando evitar la formación de burbujas entre el gel y la membrana. Enseguida se colocó otro papel filtro sobre la membrana y se montó cuidadosamente en la cámara de transferencia. Se aplicaron 200 mA durante 2 h, tiempo suficiente para obtener una transferencia completa de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.

Tinción de geles. Los geles se tiñeron en la solución (azul de Coomassie R-250 0.125% en metanol al 40%, ácido acético al 10%) durante 30 min; se destiñeron en una solución similar pero sin colorante, durante 1 h.

Inmunodetección. Después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se colocó en una solución de leche sin grasa al 5% en TBS-T pH 7.6 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%), durante 1 h después, se incubó con el anticuerpo anti-His tag 6X de Santa Cruz (dilución 1:500) en TBS-T leche 1% durante toda la noche. La membrana se lavó tres veces durante 10 min en una solución de TBS-T y se incubó con un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz) que reconoce el primer anticuerpo, en una dilución 1:2000 en TBS-T durante 1 h. Nuevamente se lavó la membrana tres veces durante 10 min para eliminar el exceso de anticuerpo. Como control se incubó una membrana solamente con el segundo anticuerpo (anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina).

El revelado se llevó a cabo incubando la membrana con 5 mL del reactivo BCIP/NBT-azul, hasta que apareciera una marca de color púrpura que es producto de la hidrólisis del 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato (BCIP) y la reducción del azul nitro de tetrazolio (NBT) al ser usados como sustratos de la fosfatasa alcalina, que está acoplada al segundo anticuerpo, el cual reconoce al primer anticuerpo anti-His tag 6X.

Separación del fragmento p1NH₂ mediante electroelución. Se resolvieron las proteínas contenidas en 300 uL del producto de la reacción de RTS mediante SDS-PAGE (12% preparativo, 2 mm). Después de la electroforesis el gel se incubó en el amortiguador de elusión (Tris-HCl 50 mM, ácido bórico 25 mM pH 8.7, sin ajustar con ácido o base) durante 15-20 min. La cámara de electroelución (Bio-Rad, No. Cat. 165-1250) se preparó colocando papel filtro y papel celofán en

el ánodo, ambos humedecidos en el amortiguador de elusión, éstos se colocaron al centro de la cámara, luego se llenaron los pozos con el mismo amortiguador. El gel se colocó sobre el centro de la cámara y se retiraron las burbujas, después se puso sobre el gel más papel filtro humedecido en el amortiguador y por último se colocó el cátodo. La elusión de las proteínas se realizó durante 1 h a 200 mA. Las muestras se recuperaron por vacío utilizando el recolector de muestras (Bio-Rad, No. Cat. 165-1250). Al término de la elusión el gel se tiñó en azul de Coomassie.

Separación del fragmento p1NH₂ mediante cromatografía de afinidad. El producto total de la reacción de RTS contenido en 500 µL se separó mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de ácido nitrilotriacético níquel (NTA-Ni²⁺) agarosa. La columna se preparó colocando 1 mL de la matriz al cual se le hizo tres lavados con 2 mL de agua destilada estéril, después se equilibró pasando 3 veces 2 mL del amortiguador de unión (8 M urea, 20 mM Na₃PO₄, 500 mM NaCl, pH 7.8). La muestra se preparó colocando 500 µL del producto total de RTS en 500 µL del amortiguador de unión. Después se aplicó la muestra a la columna y se incubó en agitación a 4°C durante 30 min, se dejó que la matriz se asentara y se pasaron 2 veces 2 mL del amortiguador (8 M urea, 20 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, pH 6.0), después se realizaron 2 lavados con 2 mL del amortiguador (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol), finalmente la proteína se eluyó utilizando el amortiguador (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol). Se colectaron 4 fracciones de 1 mL las cuales se dializaron durante toda la noche a 4°C utilizando el amortiguador (0.1% Triton X100, 10 mM Tris-HCl pH 6). Las muestras se concentraron a 200 µL utilizando vacío.

VI. RESULTADOS

Amplificación del fragmento GABAp1 mediante (PCR)

Con el objeto de incluir sitios de clonación *Nco*I y *Xma*I en el DNAC GABAp1 se realizó la PCR con el “primer” sentido p1 5' *Nco*I y el primer antisentido p1 3' *Xma*I. El fragmento se amplificó tomando como molde el plásmido pcDNA_{3.1}-p1. Al término de la reacción de PCR el fragmento se separó en un gel de agarosa (Figura 7). Como control de la amplificación se realizó la reacción de PCR utilizando todos los reactivos excepto el plásmido pcDNA-p1.

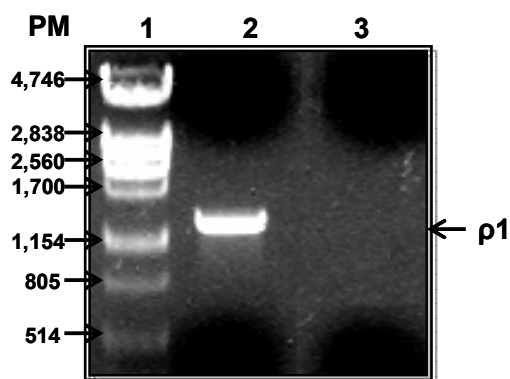


Figura 7. Amplificación del DNAC de la subunidad GABAp1. Carril 1 marcador de peso molecular (λ *Pst*I), carril 2 amplificación de p1, carril 3 control negativo de la amplificación. Imagen obtenida por exposición a luz UV.

Clonación del fragmento p1 en el plásmido pGEM-T Easy

Se clonó GABAp1 en el plásmido pGEM-T Easy. Para la identificación se aisló el DNA plasmídico de varias colonias (Figura 8). Se utilizó como referencia el plásmido pGEM-T Easy sin inserto. Las bandas de mayor peso molecular corresponden a plásmidos que contienen el fragmento GABAp1 en dos (carriles 1-4). Los plásmidos se presentan en dos diferentes conformaciones del DNA: relajado banda de arriba y superenrrollado banda de abajo

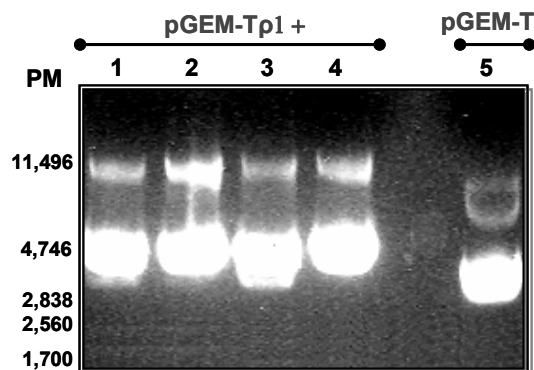


Figura 8. Identificación del plásmido pGEM-T Easy que incorporó el fragmento p1. Carril 1-4 plásmidos que incorporaron el fragmento, Carril 5 pGEM-T Easy sin inserto; los plásmidos están presentes en la conformación relajado y superenrrollado. Imagen obtenida por exposición a luz UV.

Caracterización enzimática de la construcción pGEM-T ρ1

Para comprobar la identidad de los plásmidos pGEM-T con ρ1 se realizó una digestión de dos muestras con la enzima *EcoR*I. Se separaron las muestras en un gel de agarosa generándose tres fragmentos de: 2,997 pb, y los fragmentos de 705 y 699 pb que aparecen como una sola marca debido a su similitud en pesos carril 2 y 3 (Figura 9A). En la Figura 9B se observa el mapa de restricción que muestra el tamaño de los tres fragmentos generados por la digestión de la construcción con *EcoR*I.

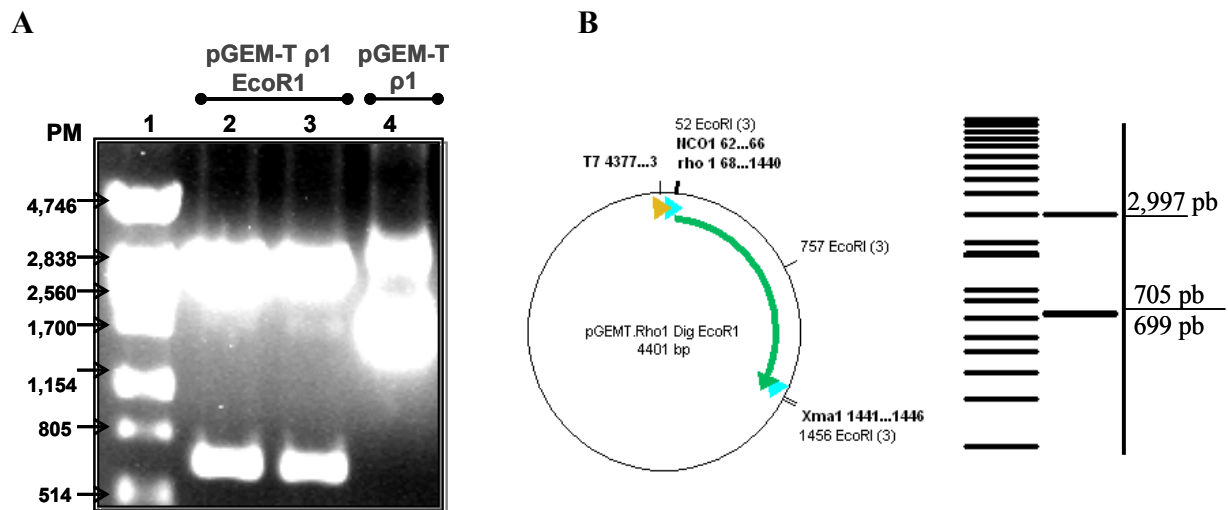


Figura 9. Caracterización de la construcción pGEM-T ρ1. (A) Carril 1 marcador de peso molecular (λ *Pst*I), carriles 2 y 3 digestión con la enzima *EcoR*I, carril 4. Construcción pGEM-T ρ1 sin digerir. (B) Mapa de restricción en el que se muestra el tamaño de los tres fragmentos generados. Imagen obtenida por exposición a luz UV.

Secuenciación de los fragmentos de la construcción pGEM-T ρ1

Para corroborar la identidad del fragmento GABAp1 clonado en el plásmido pGEM-T, se determinó su secuencia en la unidad de proteogenómica del Instituto de Neurobiología (INB). Después se realizó un análisis de su secuencia con lo que se comprobó su identidad y también que no presentaba mutaciones en su secuencia nucleotídica.

Subclonación del fragmento $\rho 1$ en los plásmidos para expresión pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d}

Para poder expresar el fragmento $\rho 1$ en un sistema libre de células se clonó el fragmento en los plásmidos de expresión pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d}. Los plásmidos pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d} son vectores que dirigen la transcripción bajo la regulación del promotor de la T7 RNA polimerasa. Además, en el extremo 5' no traducible contiene la secuencia Shine- Delgarno que favorece la unión del transcrito al ribosoma, el plásmido pIVEX_{2,3d} en el extremo 3' contiene una secuencia que codifica para el epítipo His 6X mientras que para el plásmido pIVEX_{2,4d} se encuentra en el extremo 5'. Para la identificación de los plásmidos que portan el DNAc del receptor, se separó el DNA plasmídico en un gel de agarosa (Figura 10A). Aquí se muestra el plásmido pIVEX_{2,3d} que incorporó el fragmento GABA $\rho 1$ (carril 9), en los demás carriles se muestran plásmidos que no incorporaron el fragmento (carriles 2-8, 10 y 11). La Figura 10B muestra los resultados de clonación del fragmento $\rho 1$ en el plásmido pIVEX_{2,4d}. En los carriles 3 y 6 se muestran plásmidos que incorporaron el fragmento $\rho 1$, los demás carriles corresponden a plásmidos que no incorporaron el fragmento.

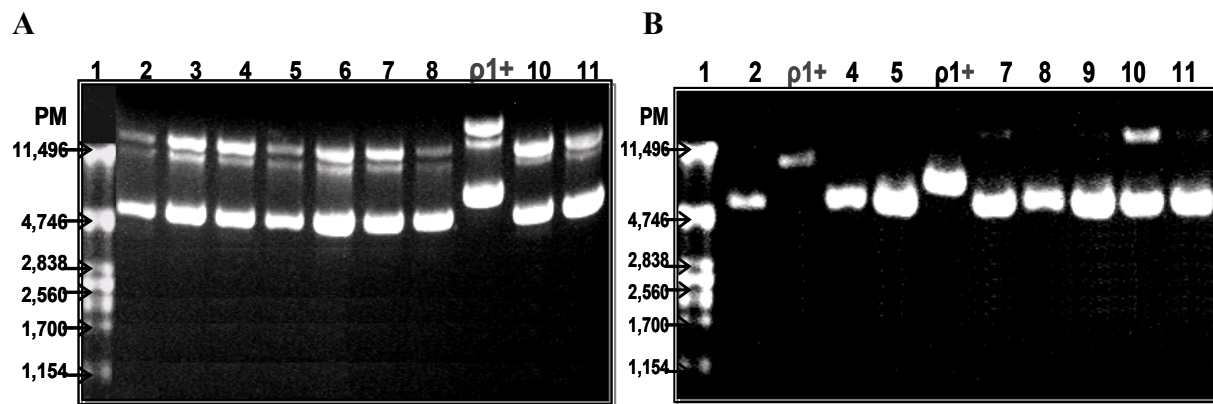


Figura 10. Identificación de los plásmidos pIVEX_{2,3d} y pIVEX_{2,4d} que incorporaron el fragmento $\rho 1$. (A) Carril 1 marcador de peso molecular (λ Pst1), carril 9 clona positiva, carriles 2-8, 10 y 11, clonas negativas. (B) Identificación de plásmidos pIVEX_{2,4d} que incorporaron el fragmento $\rho 1$: carril 1 marcador de peso molecular, carril 3 y 6 clonas positivas, carril 4, 5, 7-11 clonas negativas. Los plásmidos están presentes en la conformación relajado y superenrollado. Imagen obtenida por exposición a luz UV.

Caracterización enzimática de la construcción pIVEX_{2,3}d p1

Para comprobar que GABA ρ 1 se ligó al plásmido pIVEX_{2,3}d se realizó una digestión con la enzima *Eco*R1 de la muestra que fue positiva en la identificación por tamaño (Figura 10). Se separó la muestra digerida en un gel de agarosa generándose tres fragmentos: 3,627 pb, 729 pb y 543 pb (carril 2 Figura 11A). El tamaño de cada fragmento fue determinado por comparación con las bandas del marcador de peso molecular del fago λ digerido con la enzima *Pst*1 (carril 1). En el carril 3 se observa el plásmido pIVEX_{2,3}d p1 sin digerir. En la figura 11B se observa el mapa de restricción en el que se muestran los tamaños de los tres fragmentos generados con *Eco*R1.

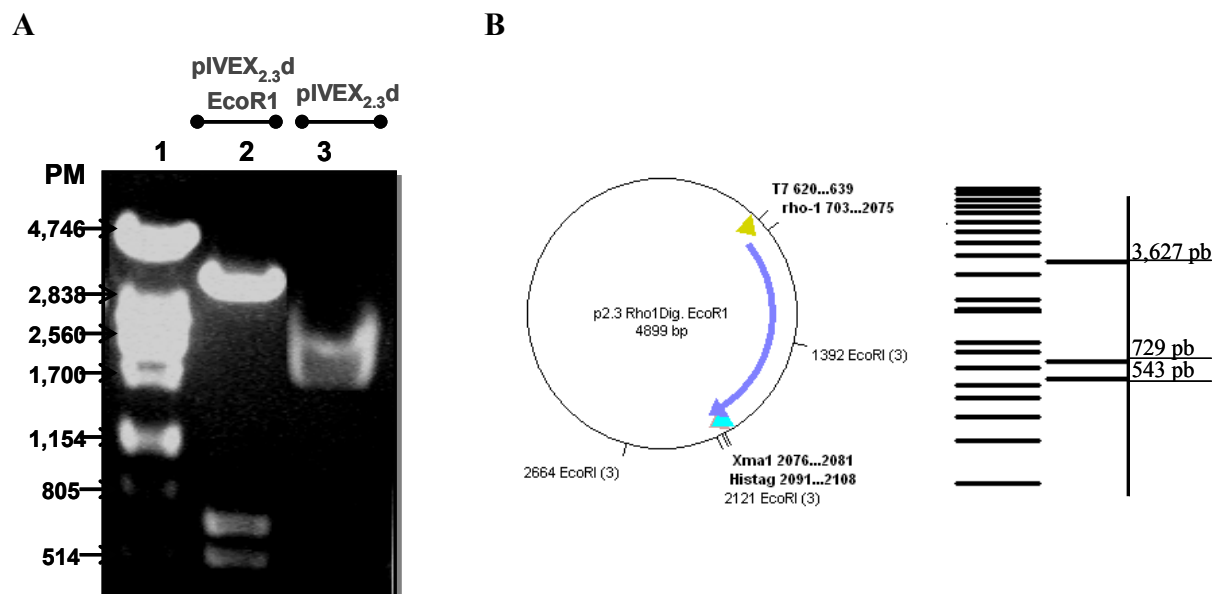


Figura 11. Caracterización de la construcción pIVEX_{2,3}d p1. (A) Carril 1 marcador de peso molecular (λ *Pst*1), carril 2 construcción pIVEX_{2,3}d p1 digerido con *Eco*R1, carril 3 construcción pIVEX_{2,3}d p1 sin digerir. (B) Mapa de restricción en el que se muestran el tamaño de los tres fragmentos generados. Imagen obtenida por exposición a luz UV.

Caracterización enzimática de la construcción pIVEX_{2,4}d p1

De la misma manera en que se comprobó la construcción pIVEX_{2,3}d p1 se realizó para la construcción pIVEX_{2,4}d p1. Para ello, una de las muestras que fueron positivas en la identificación por tamaño se digirió con la enzima *Eco*R1. Se separó la muestra en un gel de agarosa generándose dos fragmentos: 3,702 pb y 1,228 pb (carril 2, Figura 12A). El tamaño de

cada fragmento se determinó por comparación con las bandas del marcador de peso molecular del fago λ digerido con la enzima *Pst*I (carril 1). En el carril 3 se observa el plásmido pIVEX_{2.4d} ρ 1 sin digerir. En la Figura 12B se observa el mapa de restricción en el que se muestran los tamaños de los dos fragmentos generados por la digestión de la construcción con *Eco*R1.

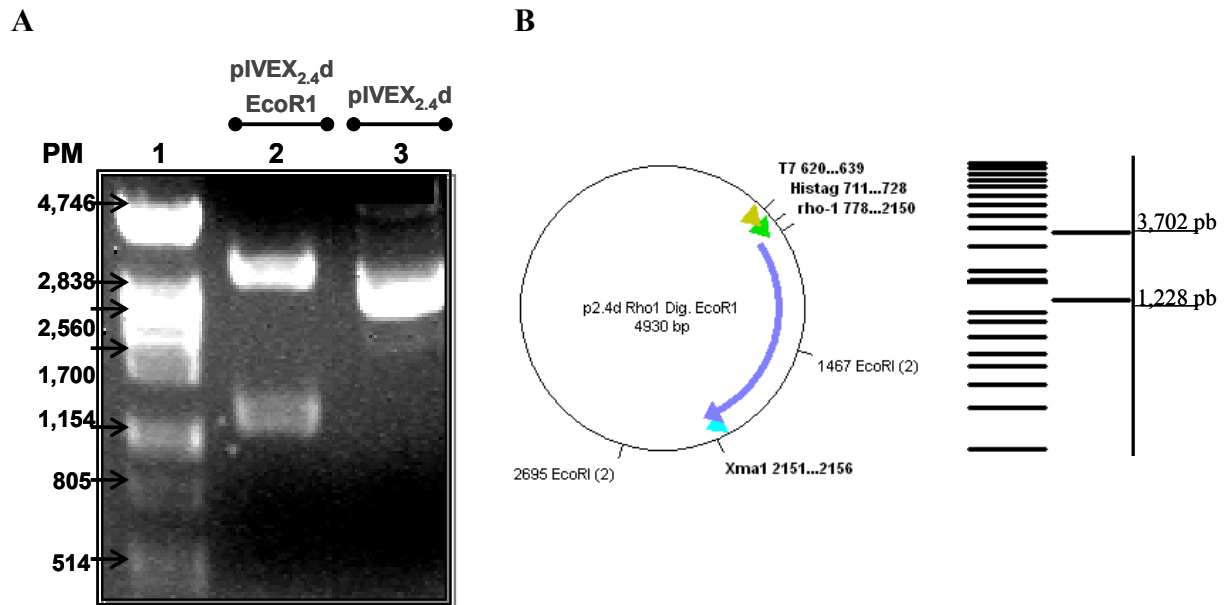


Figura 12. Caracterización de la construcción pIVEX_{2.4d} ρ 1. (A) Carril 1 marcador de peso molecular (λ *Pst*I), carril 2 digestión enzimática de la construcción pIVEX_{2.4d} ρ 1, carril 3 construcción pIVEX_{2.4d} ρ 1 sin digerir. (B) Mapa de restricción en el que se muestran los tamaños de los dos fragmentos generados. Imagen obtenida por exposición a luz UV.

Análisis del marco de lectura en las construcciones pIVEX_{2.3d} ρ 1 y pIVEX_{2.4d} ρ 1

Para corroborar que las construcciones pIVEX_{2.3d} ρ 1 y pIVEX_{2.4d} ρ 1 se encuentran en el marco de lectura correcto, se secuenció cada plásmido (electroferograma apéndices I y II). Los resultados corroboraron la identidad del fragmento en los extremos 5' y 3' que resultó estar en fase dentro de la secuencia de cada plásmido.

Expresión del fragmento $\rho 1$ mediante un sistema rápido de traducción (RTS) libre de células

Para realizar la expresión del fragmento $\rho 1$ mediante RTS se colocaron cantidades iguales (10 μg) de las dos construcciones realizadas pIVEX_{2,3}d $\rho 1$ y pIVEX_{2,4}d $\rho 1$ y de la construcción pIVEX_{2,3}d GFP que es utilizada como control positivo de la expresión (Figura 13A carril 1, 2 y 3) respectivamente. La reacción se llevó a cabo durante 24 h y después las proteínas se maduraron durante 24 h a 4°C. La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) se identificó observando la fluorescencia emitida por exposición a luz UV (Figura 13B tubo 3). Los tubos 1 y 2 corresponden a la expresión del fragmento $\rho 1$ en las construcciones pIVEX_{2,3}d $\rho 1$ y pIVEX_{2,4}d $\rho 1$ respectivamente.

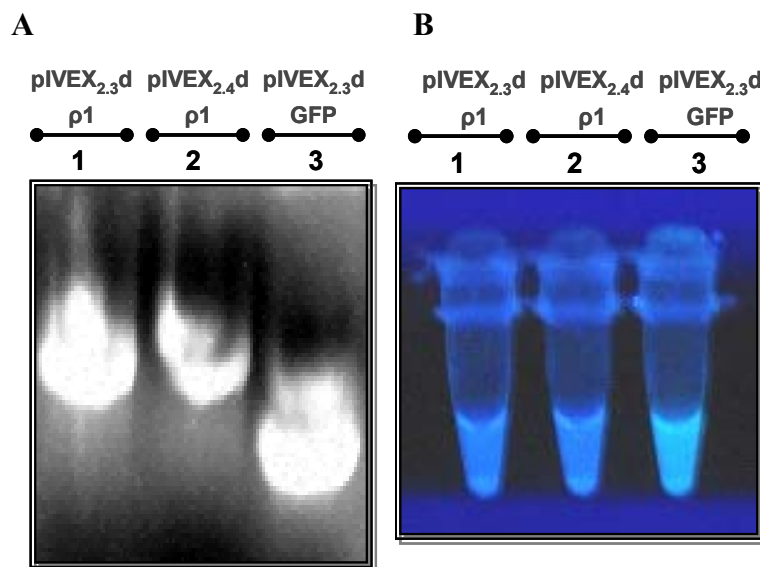


Figura 13. Plásmidos pIVEX_{2,3}d $\rho 1$ y pIVEX_{2,4}d $\rho 1$ utilizados en la reacción de RTS. (A). Carril 1 construcción pIVEX_{2,3}d $\rho 1$, carril 2 construcción pIVEX_{2,4}d $\rho 1$, carril 3 construcción pIVEX_{2,3}d GFP. (B) Productos de reacción de RTS después de 24h de maduración. Tubo 1 construcción pIVEX_{2,3}d $\rho 1$, tubo 2 pIVEX_{2,4}d $\rho 1$ y tubo 3 construcción pIVEX_{2,3}d GFP. Imágenes obtenidas por exposición a luz UV.

Inmunodetección del fragmento $\rho 1$ en el producto de reacción de RTS

Para determinar la expresión del fragmento $\rho 1$, las proteínas producidas durante la reacción de RTS se separaron en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, después se realizó la inmunodetección utilizando un anticuerpo dirigido contra el epítipo His 6X. En la Figura 14A se muestran los resultados de detección de la expresión; GABA $\rho 1$ no se detectó en el precipitado ni en el sobrenadante del producto de la reacción aun

cuando se utilizaron las dos construcciones (pIVEX_{2,3}d p1 y pIVEX_{2,4}d p1) o cuando se utilizó el anticuerpo N-19 (datos no mostrados) que reconoce parte de los residuos del extremo amino del receptor GABA_C. En el carril 2, se observa la detección de la proteína verde fluorescente (GFP) con una movilidad relativa de 35 kDa como un control positivo de la expresión; en el carril 3 se separó el producto total de la reacción de RTS realizada en paralelo pero utilizando plásmido sin inserto (control negativo de la expresión). En la Figura 14B se muestran los resultados obtenidos con algunas de estas mismas muestras pero incubadas únicamente con el anticuerpo secundario como control de inespecificidad de este anticuerpo; se observa una marca en todos los carriles que también está presente en la Figura 14A por lo que se atribuye a una unión inespecífica del anticuerpo secundario. Con este resultado se concluye que no hay expresión de dicho fragmento mediante el uso de la expresión libre de células (n=4).

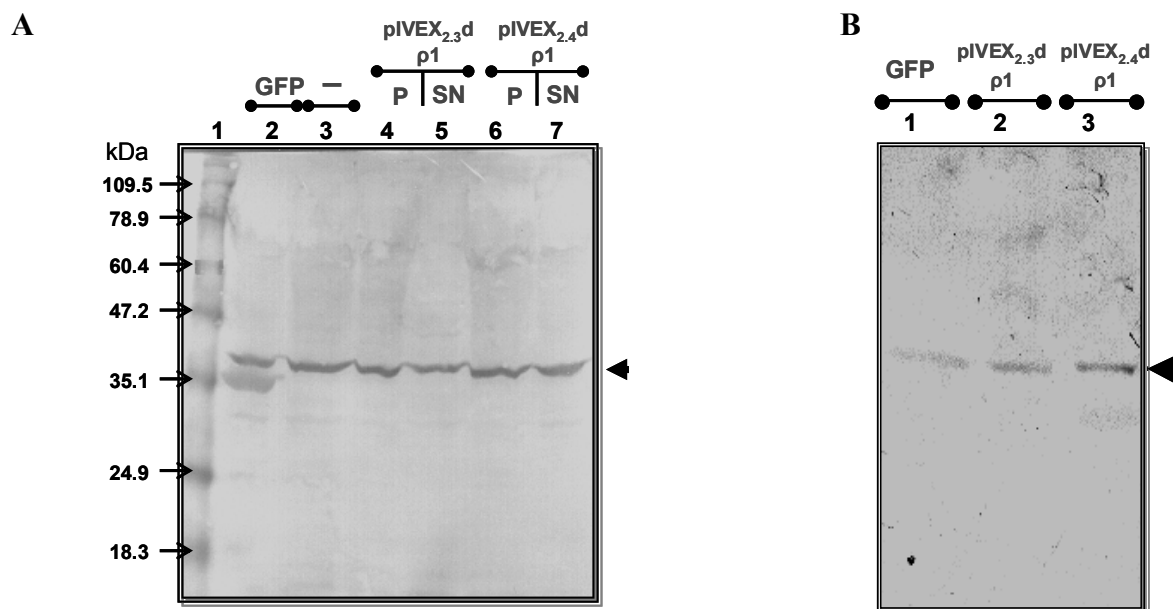


Figura 14. Inmunodetección del fragmento p1. (A) Inmunodetección utilizando un anticuerpo dirigido contra el epítipo His 6X. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 detección de GFP, carril 3 producto de RTS utilizando plásmido sin inserto como control negativo de la expresión, carriles 4 y 6 precipitado (P) del producto de expresión con las construcciones pIVEX_{2,3}d p1 y pIVEX_{2,4}d p1 respectivamente, y carriles 5 y 7 separación de los sobrenadantes (SN) de las muestras separadas en 4 y 6. (B) Separación del producto total de RTS de las mismas muestras que se muestran en la Figura A pero incubando solamente con el anticuerpo secundario. Las cabezas de flecha indican reconocimiento inespecífico detectado con el segundo anticuerpo.

Se cumplieron los primeros tres objetivos planteados, pero no fue posible determinar la expresión de la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C. Por consiguiente, se decidió implementar una nueva alternativa en la cual se expresó un fragmento más pequeño con características más hidrofílicas correspondiente a 259 aminoácidos del extremo amino de la misma subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C sin considerar el péptido señal. Dicho fragmento se denotó con la abreviación $\rho 1\text{NH}_2$. Para la expresión se utilizó también un nuevo sistema de traducción rápida libre de células que permite la formación de puentes disulfuro (kit *E. coli* Disulfide, No. Cat. 04 349 741 001).

Amplificación del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ de la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C

Se realizó la PCR utilizando los “primers” sentido NT-5’*Nco*I y antisentido NT-3’*Xma*I. El fragmento se amplificó tomando como molde el plásmido pcDNA_{3.1}- $\rho 1$. Al término de la reacción, el fragmento amplificado de 777 pb se separó en un gel de agarosa (Figura 15). Como control de la amplificación se realizó la reacción de PCR utilizando todos los reactivos excepto el plásmido pcDNA₃- $\rho 1$.

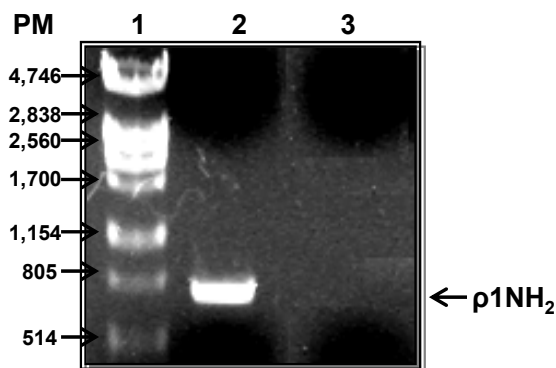


Figura 15. Amplificación del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$. Carril 1 marcador de peso molecular (λ *Pst*I), carril 2 amplificación del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$, carril 3 control negativo de la amplificación. Imagen obtenida por exposición a luz UV.

Clonación del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ en el plásmido pGEM-T

Se clonó el fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ en el plásmido pGEM-T Easy. Para la identificación de los plásmidos que incorporaron el fragmento, se comparó el tamaño por electroforesis en gel del DNA plasmídico de cada una de las colonias positivas, con el DNA de una colonia que no incorporó el fragmento (Figura 16).

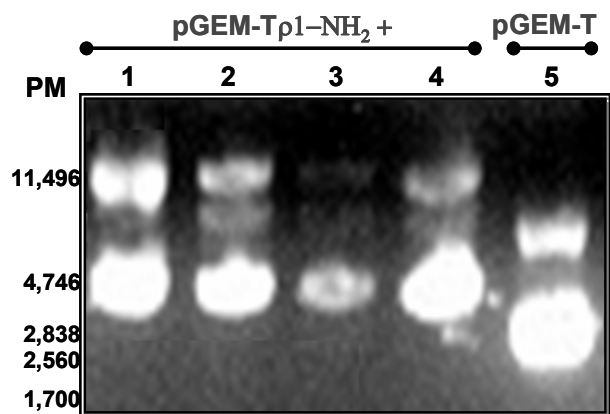


Figura 16. Identificación de plásmidos pGEM-T Easy que incorporaron el fragmento $\rho 1\text{NH}_2$. Carriles 1-4 plásmidos que incorporaron el fragmento; carril 5 plásmido pGEM-T easy.

Subclonación del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ en el plásmido pIVEX_{2.3d}

Para poder expresar el fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ en un sistema libre de células, se clonó en el plásmido de expresión pIVEX_{2.3d}. Para la identificación, el DNA plasmídico de cada clon se separó en un gel de agarosa y se compararon las bandas por peso molecular. En la Figura 17 se muestran los plásmidos pIVEX_{2.3d} que incorporaron el fragmento $\rho 1\text{NH}_2$. Las bandas de mayor peso molecular corresponden a aquellos plásmidos que contienen el fragmento (+) (carriles 5, 13 y 24). Las bandas de menor peso molecular en los demás carriles corresponden a plásmidos que no incorporaron el fragmento.

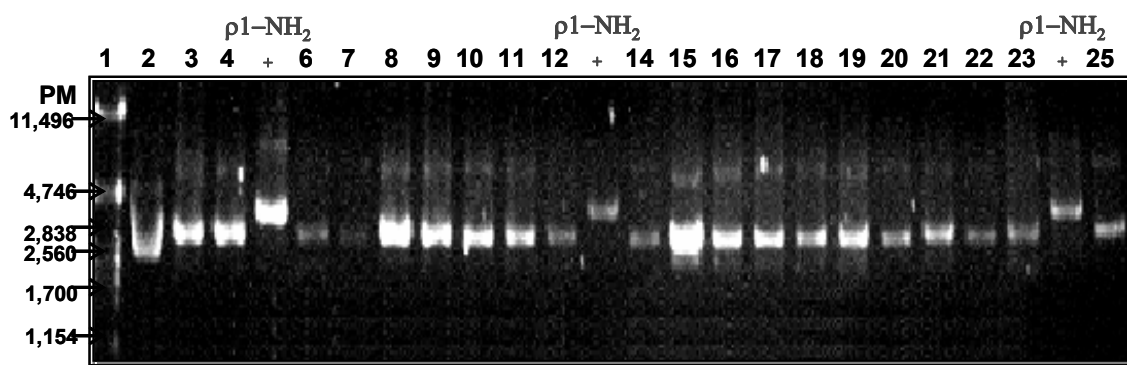


Figura 17. Identificación de los plásmidos pIVEX_{2.3d} que incorporaron el fragmento $\rho 1\text{NH}_2$. Carril 1 marcador de peso molecular (λ Pst1); carriles 5, 13, y 24 plásmidos que incorporaron el fragmento; resto de los carriles, plásmidos que no incorporaron el fragmento.

Caracterización de la construcción pIVEX_{2.3d} ρ1NH₂

Para comprobar que el fragmento ρ1NH₂ se ligó al plásmido pIVEX_{2.3d} se realizó una digestión con las enzimas *Eco*R1 generándose tres fragmentos de: 3,627 pb, 543 pb y 132 pb (carril 2, Figura 18). El tamaño de cada fragmento fue determinado por comparación con las bandas del marcador de peso molecular del fago λ digerido con la enzima *Pst*I (carril 1). En el carril 3, se observa el plásmido pIVEX_{2.3d} ρ1NH₂ sin digerir. En la figura 18B se observa el mapa de restricción en el que se muestra el tamaño de los tres fragmentos generados por la digestión de la construcción con *Eco*R1.

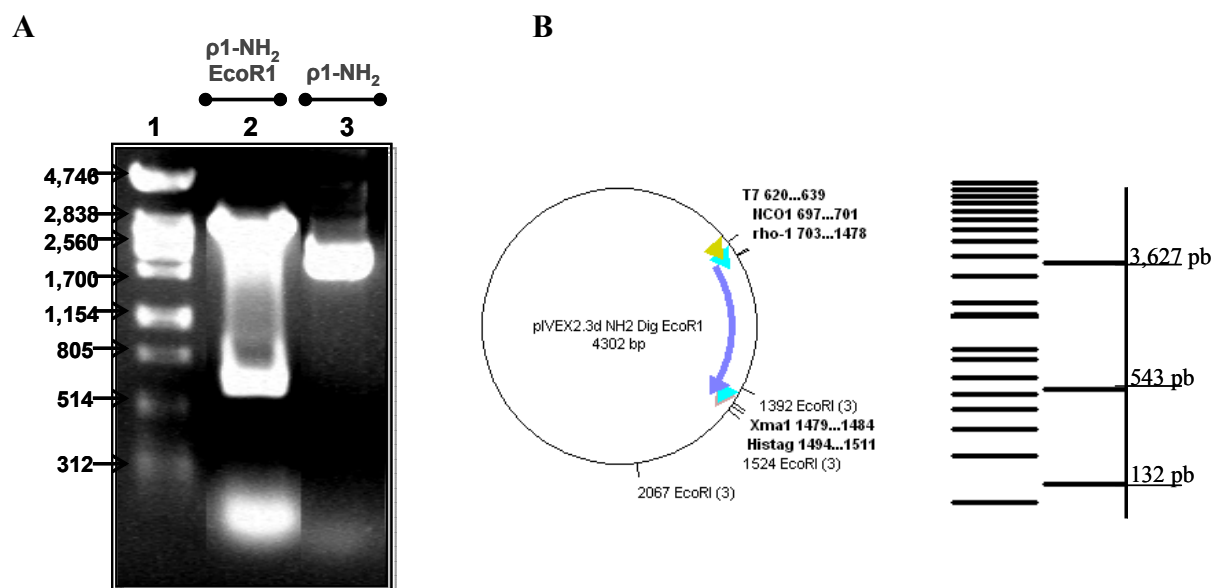


Figura 18. Caracterización de la construcción pIVEX_{2.3d} ρ1NH₂. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 fragmentos obtenidos en la digestión con *Eco* R1, carril 3 construcción pIVEX_{2.3d} ρ1NH₂ sin digerir. (B) Mapa de restricción en el que se muestran los tamaños de los dos fragmentos generados.

Análisis del marco de lectura en la construcción pIVEX_{2.3d} ρ1NH₂

Así mismo, para corroborar que la construcción pIVEX_{2.3d} ρ1NH₂ se encuentra en el marco de lectura correcto, se realizó un análisis de la secuencia junto con el electrocromatograma (Apéndice III). Los resultados corroboraron la identidad del fragmento en los extremos 5' y 3' que resultó estar en fase dentro de la secuencia del plásmido pIVEX_{2.3d}.

Expresión del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ mediante un sistema rápido de traducción (RTS) libre de células

Para realizar la expresión del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ mediante RTS, se colocaron en cantidades iguales (10 μg) de la construcción pIVEX_{2.3d} $\rho 1\text{NH}_2$ y del plásmido pIVEX_{2.3d} UK que expresa la proteína urocinasa, como control de la expresión (Figura 19).

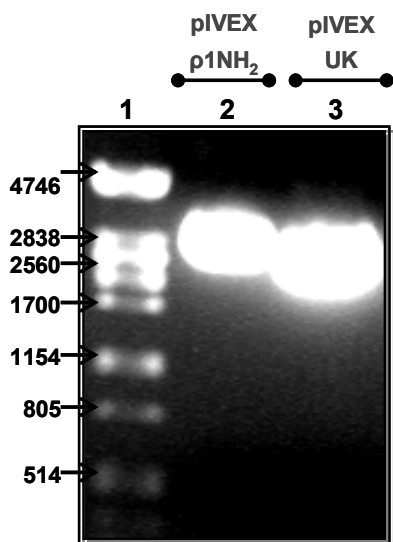


Figura 19. Separación de los plásmidos usados como molde en la reacción de RTS. Carril 1 marcador de peso molecular (λ Pst1); carril 2 pIVEX_{2.3d} $\rho 1\text{NH}_2$; carril 3 pIVEX_{2.3d} UK.

Inmunodetección del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ en el producto de la reacción de RTS

Antes de la inmunodetección del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$, las proteínas producidas en la reacción de RTS durante 24 h se resolvieron en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 12%. Mediante una tinción con azul de Coomassie, se observó la presencia de una banda con una movilidad relativa de 40 kDa que no se encuentra presente en la separación del producto de reacción obtenido utilizando el plásmido sin inserto (Figura 20A). Durante la inmunodetección realizada con el anticuerpo antiHis 6X, se detectó la presencia del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$. De la misma manera, se detectó la presencia de la urocinasa (UK) con una movilidad relativa de 33 kDa; ésta fue producida en una reacción en paralelo como control positivo de la expresión. Como control negativo, se separó el producto de reacción obtenido utilizando plásmido sin inserto (Figura 20B).

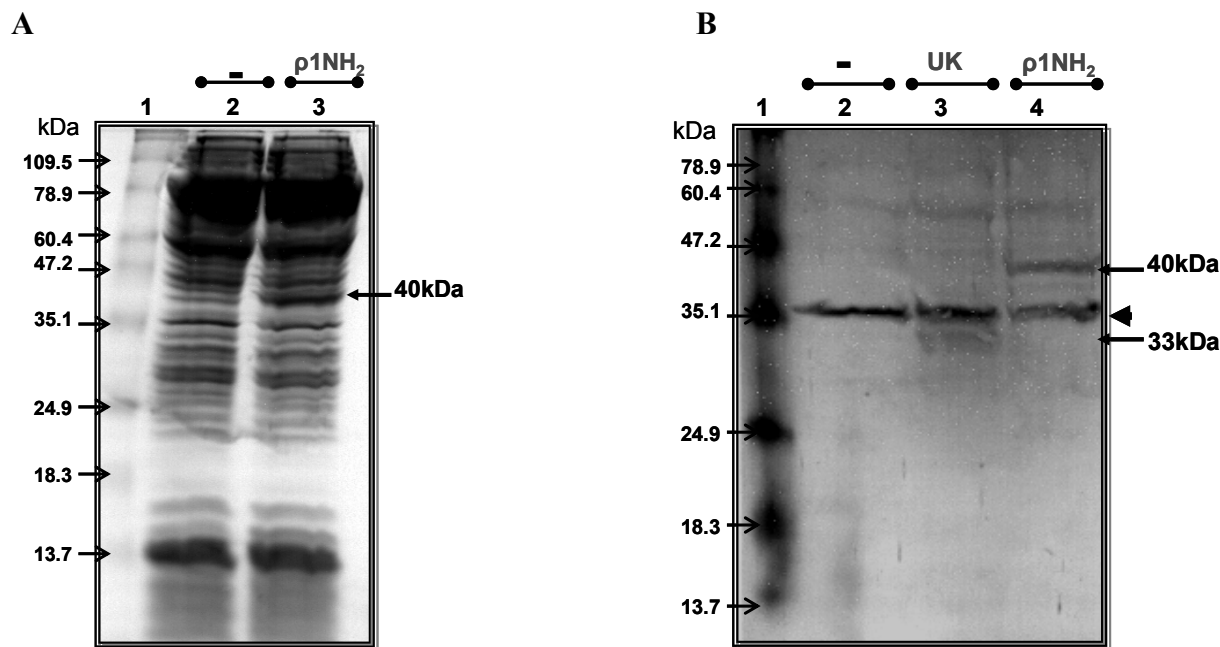


Figura 20. Inmunodetección del fragmento $p1NH_2$. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE 12%). Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 producto de RTS (control sin inserto); carril 3 producto de RTS utilizando pIVEX_{2,3}d $p1NH_2$ (40 kDa). (B) Inmunodetección con el Ac. antiHis 6X. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 control negativo; carril 3 urocinasa (33kDa), carril 4 detección del fragmento $p1NH_2$ (40kDa). Las cabezas de flecha señalan inmunodetección inespecífica del segundo anticuerpo (c.f 14).

Efecto del Triton X-100 sobre la expresión del fragmento $p1NH_2$ en RTS

Con el objeto de tratar de enriquecer la fracción soluble con el fragmento $p1NH_2$, se realizó la expresión durante 24 h en presencia y en ausencia del detergente Triton X-100. La Figura 21 muestra la inmunodetección del fragmento $p1NH_2$ en el producto total de reacción y en el precipitado, cuando la reacción se realiza en ausencia del detergente (carriles 4 y 5), no así en el sobrenadante (fracción soluble, carril 6). El mismo resultado se observó cuando se realizó la inmunodetección en las fracciones obtenidas cuando se utilizó Triton X-100 durante la reacción (carriles 7, 8 y 9). La presencia de la proteína urocinasa se utilizó como control positivo de la expresión. Como control negativo se separó el producto de reacción obtenido utilizando plásmido sin inserto.

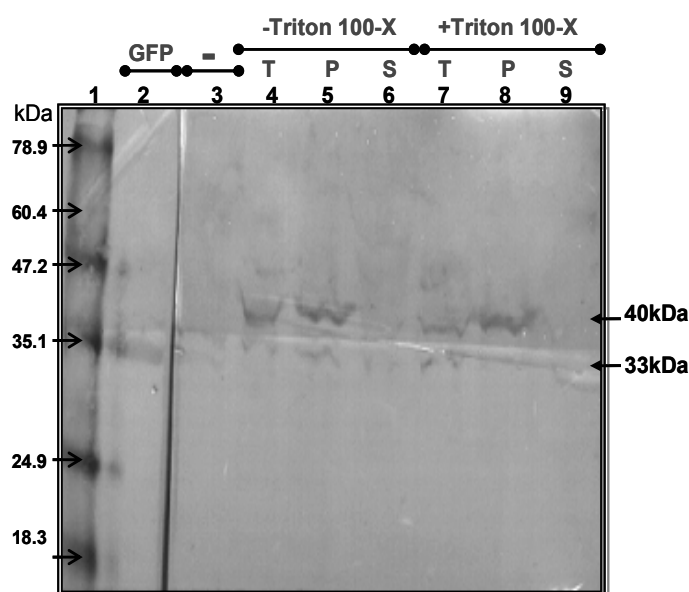


Figura 21. Inmunodetección del fragmento $p1NH_2$ del producto de reacción de RTS con y sin Triton X-100. Inmunodetección con el Ac. antiHis 6X. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 UK; carril 3 control negativo de la expresión; carriles 4-6 detección de $p1NH_2$ sin Triton X-100: en el producto total (T), en el precipitado (P) y en el sobrenadante (S); carriles 7-9 detección de $p1NH_2$ con Triton X-100: en el producto total (T), en el precipitado, (P) y en el sobrenadante (S).

Separación del fragmento $p1NH_2$ mediante electroelución

Con el fin de separar el fragmento $p1NH_2$ del resto de los productos de la reacción de RTS, se aplicó la técnica de electroelución. La Figura 22 muestra la tinción con azul de Coomassie del gel de poliacrilamida en el cual se resolvieron siete fracciones (de la 4 a la 10) que se separaron en un peso molecular cercano a la del fragmento $p1NH_2$. También se resolvió el producto total de la reacción de RTS en el cual se puede distinguir la banda correspondiente a $p1NH_2$ (carril 2).

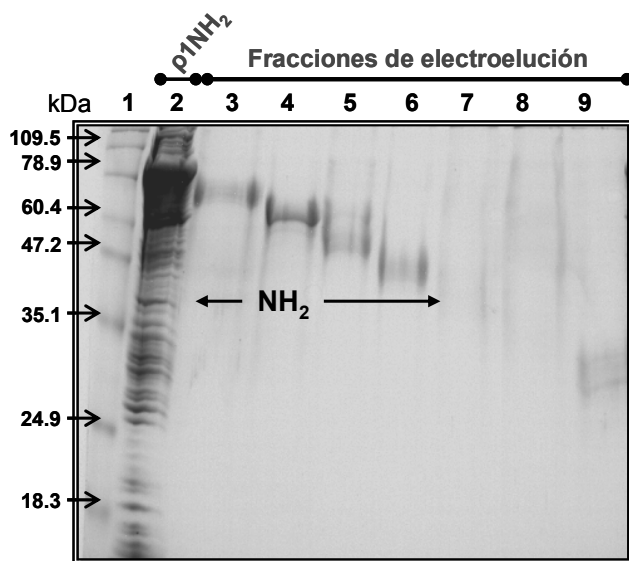


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones separadas por electroelución. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 separación del producto total de reacción de RTS; carriles 3-9 fracciones 4-10 obtenidas mediante electroelución del producto total de la reacción de RTS.

Separación del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ mediante cromatografía de afinidad

La proteína $\rho 1\text{NH}_2$ fusionada a una marca de seis histidinas, se purificó mediante cromatografía de afinidad. La fracción de elusión se resolvió mediante SDS-PAGE y se realizó una tinción con azul de Coomassie donde se aprecia claramente la presencia del polipéptido en el producto total de la reacción de RTS y en la fracción obtenida por cromatografía de afinidad (carriles 3 y 4, Figura 23A). Esta banda no se encuentra presente en el producto de RTS cuando se utilizando como molde el plásmido sin el inserto $\rho 1\text{NH}_2$ como control negativo de la expresión (carril 2). El fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ también se detectó mediante dos anticuerpos específicos diferentes, uno reconoce la marca de seis histidinas (Figura 23B) y el otro parte del dominio amino terminal de la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C (Figura 23C). El orden en el cual se resolvieron las muestras en la inmunodetección es el mismo que se muestra en el gel teñido con azul de Coomassie. Cabe señalar que en todos los casos se observó que la proteína purificada migró menos que cuando se resolvió en el extracto total.

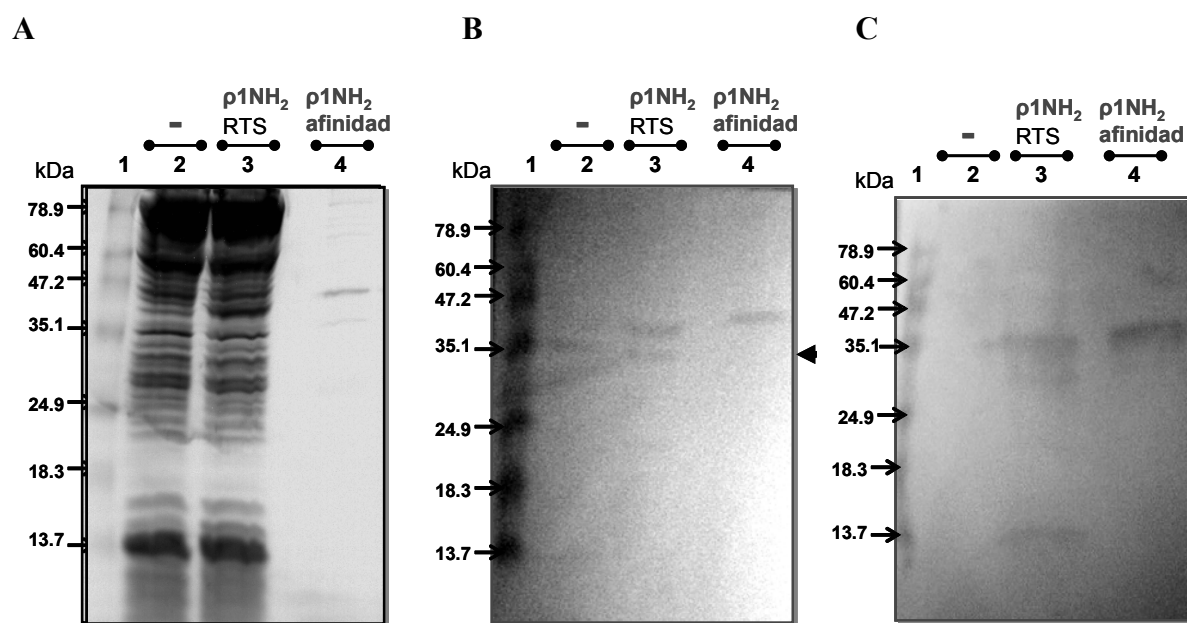


Figura 23. Inmunodetección del fragmento $\rho 1\text{NH}_2$ en la fracción obtenida por cromatografía de afinidad. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) teñido con azul de Coomassie. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 control negativo de la expresión; carril 3 producto total de RTS utilizando pIVEX_{2.3d} $\rho 1\text{NH}_2$, carril 4 fracción de elusión obtenida por cromatografía de afinidad. (B) Inmunodetección con el Ac. antiHis 6X. (C) Inmunodetección con el Ac. Anti $\rho 1$ (N-19). Las cabezas de flecha señalan inespecificidad; nótese como desaparecen después de la cromatografía.

VII. DISCUSIÓN

Con base en la homología aminoacídica que presenta el receptor GABA_C con el receptor a acetilcolina se ha sugerido que se organiza en la membrana de las neuronas formando un pentámero; tal como se organiza el receptor a acetilcolina, el cual fue estudiado mediante microscopía electrónica y difracción de rayos X (Unwin, 1995., Unwin, 2005). La subunidad $\rho 1$ fue la primera de tres subunidades clonadas que se demostró que forma receptores homoméricos GABA_C funcionales (Polenzani, y col. 1991), pero la forma en la cual se organizan los pentámeros aún no ha sido descrita. El trabajo que se ha venido realizando por el grupo de A. Martínez y R. Miledi se ha enfocado en entender los receptores GABA_C desde diversos puntos de vista. En una de sus tareas se ha propuesto entender la organización del homopentámero formado por la subunidad $\rho 1$ a nivel atómico-molecular. Con este propósito, inicialmente GABA $\rho 1$ fue expresada en *S. cerevisiae*, produciendo receptores funcionales pero el sistema resultó ineficiente para sobreproducir la proteína (Martínez-Martínez y col. 2003). Además, también se intentó su expresión en *E. coli* sin obtener la producción del receptor. Actualmente en el laboratorio se logró expresar a GABA $\rho 1$ en células de insecto trasfectadas con baculovirus recombinantes. Sin embargo, el gen que codifica para GABA $\rho 1$ no se puede expresar continuamente ya que las células infectadas mueren y la síntesis de GABA $\rho 1$ requiere de la infección de nuevas células. Por consiguiente, los rendimientos obtenidos no fueron los esperados y resulta riesgoso escalar el proceso haciendo uso de biorreactores.

El presente trabajo se enfocó a expresar la subunidad GABA $\rho 1$ en un sistema libre de células, con el objeto de purificarla para realizar futuros estudios que nos permitan entender su organización. El sistema de expresión libre de células utiliza el arquetipo procariote en el cual la transcripción y la traducción se realizan de manera acoplada, pero en un ambiente libre de membranas (Spirin, y col. 1998); en este ambiente esperábamos que se favoreciera la expresión de la proteína, sin embargo, no fue posible su producción. La falta de expresión de GABA $\rho 1$ se puede deber a un problema en el momento de la transcripción y/o traducción que impide la síntesis completa. Es probable que en los segmentos transmembranales los residuos con carácter hidrofóbico expuestos a un ambiente acuoso sufran un cambio conformacional diferente al nativo, orientando los grupos no polares en una forma inestable de la proteína, causando su mal

plegamiento y afectando su síntesis. Sin embargo, para comprobarlo es necesario realizar la expresión de diferentes fragmentos de GABA ρ 1 en el cual se consideren cada uno de los dominios transmembranales. Una modificación de este mismo sistema utilizó diversos detergentes y lípidos, para expresar el canal mecanosensible Mscl (una proteína homopentamérica formada por subunidades de 14 kDa con dos pasos transmembranales) (Berrier, 2004). En nuestro trabajo se intentó producir la subunidad ρ 1 aplicando una de las condiciones utilizadas en la sobreproducción de la proteína Mscl, pero aun en esas condiciones no fue posible su síntesis. Los factores que determinan la expresión de ambas proteínas son función de sus propiedades bioquímicas propias por lo que un mismo ambiente influencia de manera diferente a proteínas distintas (Klammt, y col. 2004). Sin embargo, aun falta por probar otro tipo de detergentes y lípidos en el cual se podría favorecer la síntesis de GABA ρ 1. Por ejemplo: considerar las condiciones en las cuales se expresaron en un sistema libre de células la proteínas de membrana EmrE, SugE y TehA (Klammt, y col. 2004) o las utilizadas en la expresión del canal Mscl (Berrier, y col. 2004).

En la segunda parte del presente trabajo nos enfocamos a expresar el dominio amino extracelular de ρ 1. La expresión de un fragmento de la proteína puede dar información sobre cómo se organiza la proteína completa. Por ejemplo, en *E. coli* se expresó un fragmento de 131 aminoácidos del dominio amino terminal que incluye el puente de cisteínas de la subunidad α 1 del receptor GABA $_A$, el cual formó oligómeros en solución. Por otra parte también se logró la expresión de un fragmento de 126 aminoácidos que comprende parte del dominio amino y los dos primeros dominios transmembranales de la subunidad α 1 del receptor de glicina (Xue, y col. 2000; Xue y col. 2001). El dominio amino extracelular de los receptores GABA $_A$ y GABA $_C$ presentan homología aminoacídica con la proteína de unión a acetilcolina (AChBP) (Katjusa y col., 2001; Hansen y col., 2005). Recientemente la secuencia aminoacídica del dominio amino del receptor GABA $_C$ fue alineada con la secuencia de la AChBP para generar un modelo tridimensional basado en la estructura cristalina de AChBP, de este modo se generó una representación de la orientación del sitio de unión a GABA (Neil, y Lummis, 2006).

Sin embargo, estos resultados *in silico* aún carecen de una base experimental. Nuestros resultados en la expresión en el sistema libre de células produjeron una proteína inmunoreactiva ante un

anticuerpo específico para el dominio amino de la subunidad GABA ρ 1 (Figura 23C). En primera instancia se trató de separar la proteína ρ 1NH₂ del resto de los productos de RTS mediante electroelución. Sin embargo, no fue posible recuperar la proteína en ninguna de las fracciones obtenidas, probablemente debido a una degradación proteolítica (Figura 22). Después se realizó una cromatografía de afinidad y las fracciones de elusión fueron positivas a la inmunodetección con anticuerpos anti ρ 1 y anti His 6X (Figura 23). La movilidad relativa de ρ 1NH₂ en el SDS-PAGE es diferente entre el producto total de la expresión y la fracción obtenida por cromatografía de afinidad; ésto se podría deber a que la muestra después de ser eluida de la columna de afinidad queda en un amortiguador diferente a las condiciones en el cual se encuentra en el producto total de expresión. Se sabe que la presencia de solutos como urea o detergentes alteran la forma y el radio efectivo de una misma proteína; los iones y las moléculas de agua unidos a la proteína modifican su carga y cambian la movilidad electroforética de ésta (García Pérez, 2000). La expresión y purificación del dominio amino de ρ 1 podría permitir realizar experimentos de microscopía electrónica, tal como lo mostraron los estudios de Xue y col. (2000 y 2001) con el receptor GABA_A y el receptor a Glicina. Con el fin de entender su organización atómica-molecular, el sistema de expresión libre de células es una alternativa para producir una proteína marcada con isótopos, facilitando hacer estudios de resonancia magnética nuclear (Kigawa y col., 1999; Noren y col., 1989). Desafortunadamente en este proyecto no se logró expresar el receptor completo y más estudios son necesarios para sobrepasar esta limitante. Como expresar diferentes fragmentos de GABA ρ 1 que incluyan parte de los dominios transmembranales en fusión con un péptido que establezca su estructura secundaria. Además también se podrían realizar estudios físico-químicos que nos ayuden a entender mejor la dinámica molecular de estas proteínas. Esto nos permitiría predecir su comportamiento en un ambiente libre de células en el cual se favoreciera la síntesis completa de GABA ρ 1.

VIII. CONCLUSIONES

1. No se logró la expresión del DNAC de $\rho 1$ mediante RTS en ninguno de los dos sistemas utilizados (RTS 100 *E. coli* HY Kit y RTS 100 *E. coli* Disulfide kit).
2. Se expresó un fragmento de 259 aminoácidos correspondiente al dominio amino terminal de la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C en el sistema RTS 100 *E. coli* Disulfide kit.
3. Se obtuvo por cromatografía de afinidad una fracción enriquecida con una proteína inmunoreactiva a un anticuerpo específico para el dominio amino terminal $\rho 1$, y para el anticuerpo anti His 6X.

IX. PERSPECTIVAS

- ♦ **Purificación y análisis físico-químico del fragmento N-terminal de $\rho 1$**
- ♦ **Expresión del fragmento N-terminal utilizando aminoácidos marcados y realizar estudios de RMN.**
- ♦ **Determinar la limitante para la expresión de GABA $\rho 1$ por RTS**
- ♦ **Aplicación de sistemas eucariotes para RTS**

X. REFERENCIAS

Alakuijala, A., Alakuijala J., Pasternak M. **(2006)**. Evidence for a functional role of GABA_C receptor in the rat mature hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **23**,514-520.

Alimov, A.P., Khmelnsky, A.Y., Simonenko, P.N., Spirin, A.S., Chetverin, A.B. **(2000)**. Cell-free synthesis and affinity isolation of proteins on a nanomole scale. *Bio Techniques.* **28**,338-344.

Berrier, C., Park, K., Abes, S., Bibonne, A., Betton, J.M., Ghazi, A. **(2004)**. Cell-Free Synthesis of a Functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent. *Biochemistry.* **43**,12585-12591.

Bonnert, T.P., Mckernan, R. M., Farrar, S., Le, B.B., Heavens, R.P., Smith, D.W., Hewson, L., Rigby, M.R., Sirinathsingji, D., Brown, N., Wafford, K.A., Whiting, P.J. **(1999)**. Theta a novel γ -aminobutyric acid type receptor subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**,9891-9896.

Booth, J.-P. **(2003)**. The trial and tribulations of membrane protein folding *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta* **1610**,51-56

Boue-Grabot, E., Roudbaraki, M., Bascles, L., Tramu, G., Bloch, B., Garret, M. **(1998)**. Expression of GABA receptor ρ subunits in rat brain. *J. Neurochem.* **70**,899-907.

Curtis, D.R., Dugggan, A.W., Felix, D., Johnston, G.A.R. **(1970)**. Bicuculline and central GABA receptor. *Nature* **228**,676-677.

Cutting, G.R., Curristin, S., Zoghbi, H., O'Hara, B., Seldin, M.F., Uhl, G.R. **(1992)**. Identification of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit $\rho 2$ cDNA and colocalization of the genes encoding $\rho 2$ (GABRR2) and $\rho 1$ (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics* **12**,801-806.

Cutting, G. R., Lu, L., O'Hara, B. F., Kash, L.M., Montrose-Rafizdeh, C., Donovan, D.M., Shimada, S., Antonarakis, S.E., Guggino, W.B., Uhl, G.R., **(1991)**. Cloning of the γ -aminobutyric

acid (GABA) $\rho 1$ cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**,2673-2677.

Chebib, M., Johnston, G.A.R., (1999). The 'ABC' receptors: a brief review. *Clinical Exp Pharm. Physiol.* **26**,937-940.

Chebib, M., Johnston, G.A.R., (2000). GABA-activated gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J. Med. Chem.. Rev.* **43**,1428-1441.

Didelon, F., Sciancalepore, M., Savic, N., Maladinic, M., Bradbury, A. Cherubini, E. (2002). γ -aminobutyric acid A ρ receptor subunits in the developing rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **67**,739-744.

DeLorey, T. M., Olsen, R. W. (1999). GABA and epileptogenesis: comparing gabrb3 gene-deficient mice with Angelman syndrome in man. *Epilepsy Res.* **2-3**,123-132.

Enz, R., Brandstatter J.H., Wässle, H., Bormann, J. (1996). Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunit in the mammalian retina. *J. Neurosci.* **16**,4479-4490

Enz, R. Cutting, G.R. (1999). GABA_C receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo-and hetero-oligomers with distinct physical properties. *J. Neurochem.* **11**,41-51.

Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J. K., Feldblum, S., Patel, N., and Tobin, A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron.* **7**,91-100

Euler, T., Wässle, H. (1998). Different contribution of GABA_A and GABA_C receptor to rod and cone bipolar cells in rat retinal slice preparation. *J. Neurophysiol.* **79**,1384-1395.

García-Pérez, H.M., (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos actualidad e importancia. *UNIV DIAG.* **2**,31-41.

Garfinkel, D., **(1996)**. A simulation study of the metabolism and compartmentation in brain of glutamate, aspartate, the Krebs cycle, and related metabolites. *J. Biol. Chem.* **241**,3918-3929.

Hansen, S.B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., Bourne, Y. **(2005)**. Structure of Aplysia AChBP complex with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J.* **24**,3635-3646.

Helle, S., Waagpetersen, Sonnewald, Ursula., and Schousboe, Arne., **(1999)**. The GABA Paradox: Multiples roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J. Neurochem.* **73**,1335-1339.

Jiang, X.P., Nakano, H., Kigawa, T., Yabuki, T., Yokoyama, S., Clark, D.S., Yamane, T. **(2001)**. Dosage effect of minor arginyl- and isoleucyl- tRNAs on protein synthesis in an *Escherichia coli* *in vitro* coupled transcription/translation system. *J. Biosci. Bioeng.* **91**,53-57.

Johnston, A.R., Graham. **(2002)**. Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology of GABA_c Receptors. *Cur.r topics. Med. Chem.* **2**,903-913.

Katjusa B., Willem, J., Van D., Remco, V., Klaassen, M., Schuurmans, J., Van der Oost, A.B. Smith, B., Titia, K.S. **(2001)**. Cristal structure of an ACh-bindig protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature.* **411**,269-276

Kaupmann, K., Huggel, K., Heids, J., **(1997)**. Expression cloning of GABA_B receptor uncovers similarity to metabotropic glutamate receptor. *Nature.* **386**,239-246.

Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuller, V., **(1998)**. GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature.* **396**,683-7.

Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., Yokoyama, S., **(1999)**. Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Lett* **442**,5-19.

Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, D., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Ishitani, R., Nureki, O., Yokiyama, S., **(2002)**. Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis, *J. Struct. Funct. Genom.* **2**,29-35.

Klammt, C., Lohr, F., Schafer, B., Haase, W., Dotsch, V., Ruterjans, C., Bernhard F., **(2004)**. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane protein. *Eur. J. Biochem.* **271**, 568-580.

Kuner, R., Kohr, G., Grunwald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., Kornau, H-C., **(1999)**. Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science*, **283**,74-7.

Laemmli, U.K. **(1970)**. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* **227**,680-685.

Lamla, T., Stiege, W., Erdmann, V.A., **(2002)**. An improved protein bioreactor. *Mol Cell. Proteomics.* **1**,466-471.

Lardi-Studler B and Fritschy J.M., **(2007)**. Matching of pre- and postsynaptic specializations during synaptogenesis. *Neuroscientist* **13**,115-126.

Le Novere, N., Changeux, J.P., **(1999)**. The ligand gated ion channel database. *Nucl. Acids Res.* **27**,340-342.

Loh, E. W., Smith, I., Murray, R., McLaughlin, M., McNulty, S., Ball, D. **(1999)**. Association between variants at the GABA_A beta2, GABA_A alpha 6 and GABA_A gamma 2 gene cluster and alcohol dependence in a Scottish population. *Mol. Psychiatry.* **4**,39-544.

Lopez-Chavez, A., Miledi, R., Martinez-Torres, A., **(2005)**. Cloning and functional expression of the bovine GABA(C) rho2 subunit molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. *Neurosci Res.*, **30**,2371-2378.

Lowry O. H. Rosebrugh, J.F., Farr, A.L. y Randall, R.J. **(1951)**. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**,265-275.

Lukasiewicz PD, Maple BR, Werblin F**(1994)**. A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina. *J. Neurosci* **14**,1202-1212.

Martínez-Martínez, A., Martínez-Torres, A., Reyes-Ruiz J., Miledi R., **(2003)**. Functional expression in frog oocytes of human $\rho 1$ receptor produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **101**,682-686.

Martinez-Torres, A., Vazquez, A.E., Panicker, M.M., Miledi, R., **(1998)**, Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the $\rho 1$ γ -aminobutyric receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**,4019-4022.

Meier, E., Herzt, L., Schousboe, A., **(1991)**. Neurotransmitters as developmental signal. *Neurochem Int*, **19**,1-15.

Nayeem, N.,Green, T.P., Martin, I. L., and Barnard, E. A., **(1994)**. Quaternary Structure of the Native GABAA ReceptorDetermined by Electron Microscopic Image Analysis. *J. Neurochem* **62**,815-818.

Neil J. H. and Sarah C.R: Lummis., **(2006)**. Locating carboxylate group of GABA in the homomeric rho GABA_A receptor ligand-binding pocket. *J. Biol. chemi.* **281**,24455-24461.

Noren, C.J., Anthony –Cahill, S.J., Griffith, M.C., Schultz, P.G., **(1989)**. A general method of site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science*. **94**,82-188.

Ogurusu, T., Shingai, R., **(1996)**. Cloning of putative γ - aminobutyric acid (GABA) receptor subunit $\rho 3$ cDNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **1305**,15-18.

Ortells, M. O.; Lunt, G. G. **(1995)**. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* **18**,121-127.

Pan, Z.H., Lipton, S.A., **(1995)**. Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals. *J. Neurosci.* **15**,2668-2679.

Parsian, A. and Zhang, Z. H. **(1999)**. Human chromosomes 11p15 and 4p12 and alcohol dependence: possible association with the GABRB1 gene. *J. Med. Genet.* **88**,533-538.

Park, K.H., Berrier, C., Martinac, B., and Ghazi, A., **(2004)**. Purification and functional reconstitution of N and C- halves of the MscL channel. *Biophys. J.* **86**,2129-2136.

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

Rabow, L.E., Russek, S.J., Farb, D.H., **(1995)**. Form ion currents to genomic analysis–recent advances in GABA, receptor research. *Synapse.* **21**,189-274.

Rosas-Arellano A., Ochoa-de la Paz L., Miledi R., Martínez-Torres A., **(2007)**. Brain distribution and molecular cloning of the bovine BABA p1 receptor. *Neuroscience Research.* **57**,347-353.

Rozzo, A., Armellin, M., Franzot, J., Chiaruttini, C., Nistri, A., Tongiorgi, E. **(2002)**. Expression and dendritic mRNA localization of GABA_A receptor p1 and p2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur. J. Neursi*, **15**,1747-1758.

Roberts, E., Frankel, S., **(1950)**. γ -Aminobutyric acid in brain: its information from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* **187**,55-63

Spirin, S.A., Baranov, V.I., Ryabova, A.L., Yu, S., Ovodov, Alakhov, Y. B., **(1988)**. A Continuous Cell-Free Translation System Capable of Producing Polypeptides in High Yield. *Science*. **242**,1162-1164.

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

Unwin, N., **(2005)**. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Bio.* **346**,967-989

Wang, T., Guggino, W.B., Cutting, G.R., **(1994)**. A novel γ -aminobutyric acid receptor subunit ($\rho 2$) cloned from human retina forms bicucullina insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* **14**,6524-6531.

Wegelius, K., Pasternack, M., Hiltunen, J.O., Rivera, C., Kaila, K., Saarma, M., Reeben, M., **(1998)**. Distribution GABA receptor ρ subunit transcripts in the rat brain. *Er. J. Neurosci.* **10**,350-357.

Wen, S and Slaughter, M. **(2001)**. Multireceptor GABAergic regulation of synaptic communication in amphibian retina. *J. Physiol.* **530**, 55-67.

Westergaard, N., Sonnewald, U., Petersen, SB., Schousboe, A., **(1995)**. Glutamate and glutamine metabolism in cultured GABAergic neurons studied by ^{13}C NMR spectroscopy may indicate compartmentation and mitochondrial heterogeneity. *Neurosci Lett* **185**,24-28.

Wu, S.M. **(1994)**. Synaptic transmission in the outer retina. *Ann Rev Physiol.* **56**,141-168.

Xue, H., Zheng H., Li H.M. Kitmitto, A., Peggy Lee, H.Z., Holzenburg A., **(2000)**. A fragment of recombinant GABA_A receptor $\alpha 1$ subunit forming rosette-like homo-oligomers. *J Biochem Biol.* **296**,739-742.

Xue, H., Shi, H., Tsang, S. Y. Zheng, H., Savva, C. G., Sun, J., Holzenburg A. **(2001)**. A recombinant glycine receptor fragment forms homo-oligomers distinct from its GABA_A counterpart. *J. Mol. Biol.* **312**,915-920.

XI. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I: Algunas características biofísicas y farmacológicas de GABA _A y GABA _C	7
Tabla II: Principales componentes del sistema de traducción rápido libre de células	12
Tabla III: Secuencia nucleotídica de los “primers” sentido y antisentido utilizados para generar el DNAC de la subunidad $\rho 1$ del receptor a GABA _C	16
Tabla IV: Reactivos utilizados en la mezcla de una reacción de PCR y condiciones en que se realizó la reacción de PCR	16
Tabla V: Reactivos utilizados para una reacción de ligación en el plásmido pGEM-T Easy	17
Tabla VI: (A) Reactivos utilizados para la reacción de doble digestión con las enzimas <i>Nco</i> 1 y <i>Xma</i> 1. (B) Reactivos utilizados durante la ligación del fragmento $\rho 1$ en los plásmidos pIVEX2.3d pIVEX _{2,4d}	19
Tabla VII: Mezcla de los reactivos para la reacción de RTS	20
Fig. 1: Modelo topológico de una subunidad del receptor GABA _C	3
Fig. 2: Estructura oligomérica del receptor GABA _C	3
Fig. 3: Modelo topológico del heterodímero formado por el receptor GABA _B	4
Fig. 4: Estrategia general de clonación de los fragmentos $\rho 1$ y $\rho 1\text{NH}_2$ en los plásmidos de expresión pIVEX _{2,3d} y/o pIVEX _{2,4d} a partir del plásmido pcDNA _{3.1} - $\rho 1$	14
Fig. 5: Estrategia para la clonación de $\rho 1$ en el plásmido pGEM-T Easy	17
Fig. 6: Subclonación dirigida de $\rho 1$ en los plásmidos pIVEX _{2,3d} y pIVEX _{2,4d}	18
Fig. 7: Amplificación del DNAC de la subunidad GABA $\rho 1$	24
Fig. 8: Identificación del plásmido pGEM-T Easy que incorporó el fragmento $\rho 1$	24
Fig. 9: Caracterización de la construcción pGEM-T $\rho 1$	25
Fig.10: Identificación de los plásmidos pIVEX _{2,3d} y pIVEX _{2,4d} que incorporaron el fragmento $\rho 1$	26
Fig. 11: Caracterización de la construcción pIVEX _{2,3d} $\rho 1$	27
Fig. 12: Caracterización de la construcción pIVEX _{2,4d} $\rho 1$	28
Fig. 13: Plásmidos pIVEX _{2,3d} $\rho 1$ y pIVEX _{2,4d} $\rho 1$ utilizados en la reacción de RTS	29

Fig. 14: Inmunodetección del fragmento $\rho 1$	30
Fig. 15: Amplificación del fragmento $\rho 1NH_2$	31
Fig. 16: Identificación de plásmidos pGEM-T Easy que incorporaron el fragmento $\rho 1NH_2$	32
Fig. 17: Identificación de los plásmidos pIVEX _{2,3} d que incorporaron el fragmento $\rho 1NH_2$	32
Fig. 18: Caracterización de la construcción pIVEX _{2,3} d $\rho 1NH_2$	33
Fig. 19: Separación de los plásmidos usados como molde en la reacción de RTS	34
Fig. 20: Inmunodetección del fragmento $\rho 1NH_2$	35
Fig. 21: Inmunodetección del fragmento $\rho 1NH_2$ del producto de reacción de RTS con y sin Triton X-100	36
Fig. 22: Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones separadas por electroelución	36
Fig. 23: Inmunodetección del fragmento $\rho 1NH_2$ en la fracción obtenida por cromatografía de afinidad	37

XII. LISTA DE ABREVIATURAS

AChBP.- Proteína de unión a acetilcolina

ATP.- Trifosfato de adenosina

BCIP.- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl
phosphate

CACA.- Ácido cis-4-aminocrotónico

DNA.- Ácido desoxirribonucleico

DNAc.- Ácido desoxirribonucleico cadena
complementaria

EDTA.- Ácido etilendiaminotetraacético

EF.- Factor de elongación

GABA.- Ácido γ -aminobutírico

GAD.- Glutamato descarboxilasa

GDP.- Guanina difosfato

GFP.- Proteína verde fluorescente

IF's.- Factores de iniciación

INB.- Instituto de Neurobiología

IPTG.- Isopropil- β -tiogalactósido

LB.- medio Luria Bertoni

NBT.- Nitro blue tetrazolium

NTA-Ni²⁺.- Ácido nitrilotriacético-níquel

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa

P4S.- Ácido 4, piperidina-4-sulfónico.

RBS.- Sitio de unión al ribosoma

RF.- Factor de terminación

RMN.- Resonancia magnética nuclear

RNA.- Ácido ribonucleico

RTS.- Sistema de transcripción y traducción
rápida

SDS-PAGE.- Electroforesis en gel de
poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio

SNC.- Sistema nervioso central

TEMED.- N,N,N,N'-tetrametilendiamina

THIP.- 3,4,5,6,7-tetrahidroisoxanol(4,5-c)-
3-ol

tRNA.- Ácido ribonucleico de transferencia

TPMPA.- Ácido(1,2,5,6-tetrahidropiridina-
4)-metilfosfónico

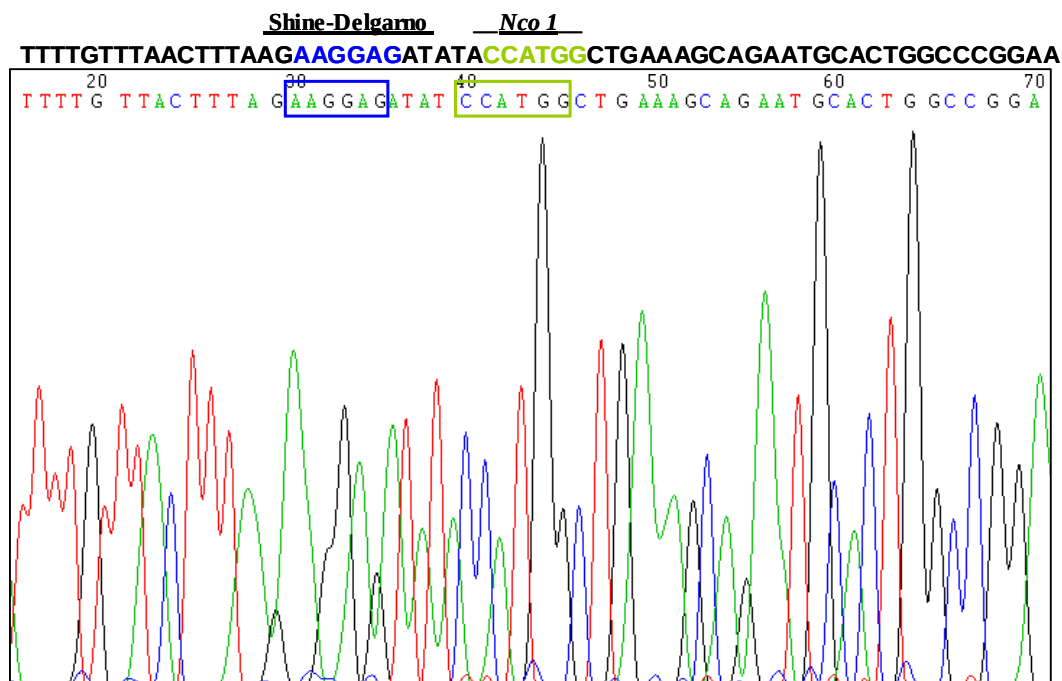
UK.- Proteína urocinasa

2-metil-TACA.- Ácido Trans-4-amino-2-
metilbital-2-enóico

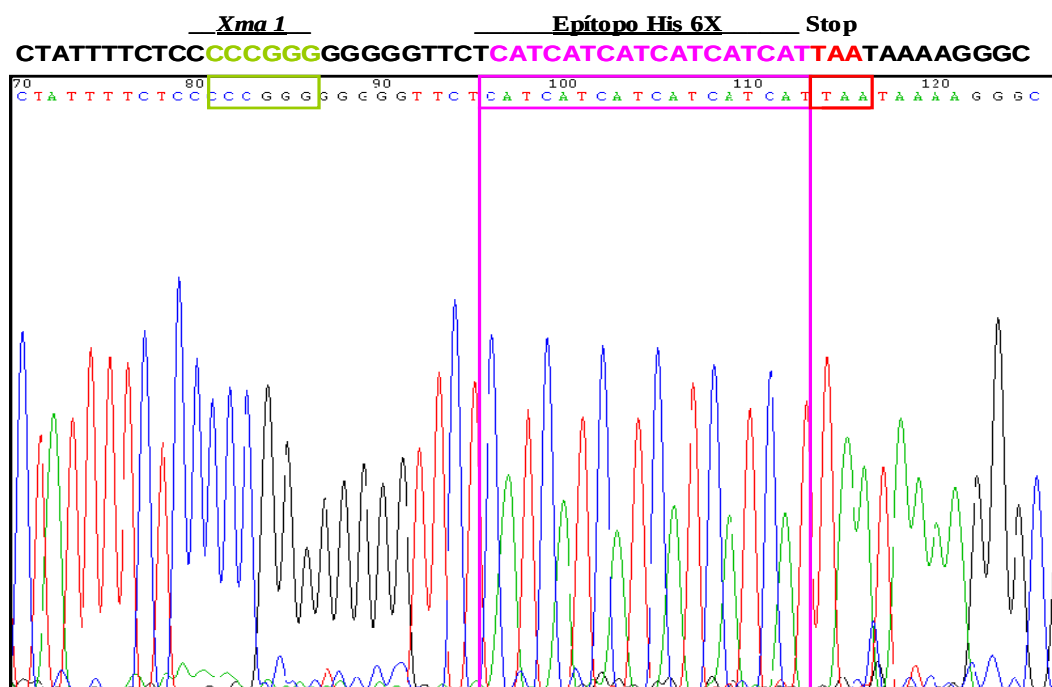
(+)CAMP.- Ácido 2,1S,2R-2-
aminometilciclopropanocarboxílico

XIII. Apéndice I

Electroferograma del extremo 5' del fragmento $\rho 1$ clonado en el plásmido pIVEX2_{2,3d}

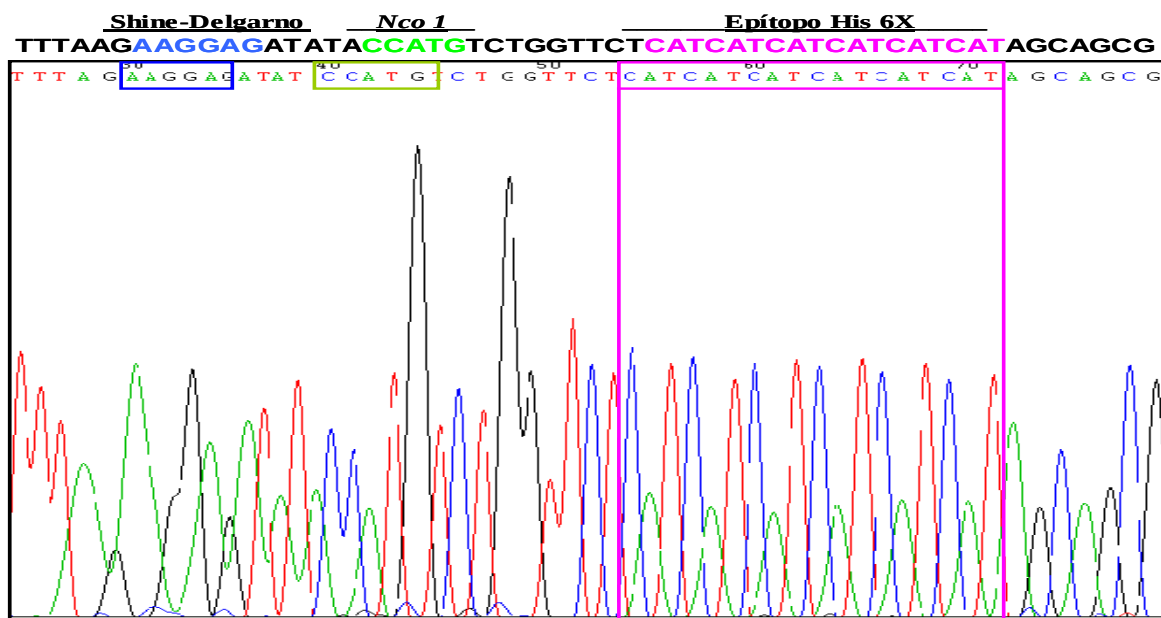


Electroferograma del extremo 3' del fragmento $\rho 1$ clonado en el plásmido pIVEX2_{2,3d}

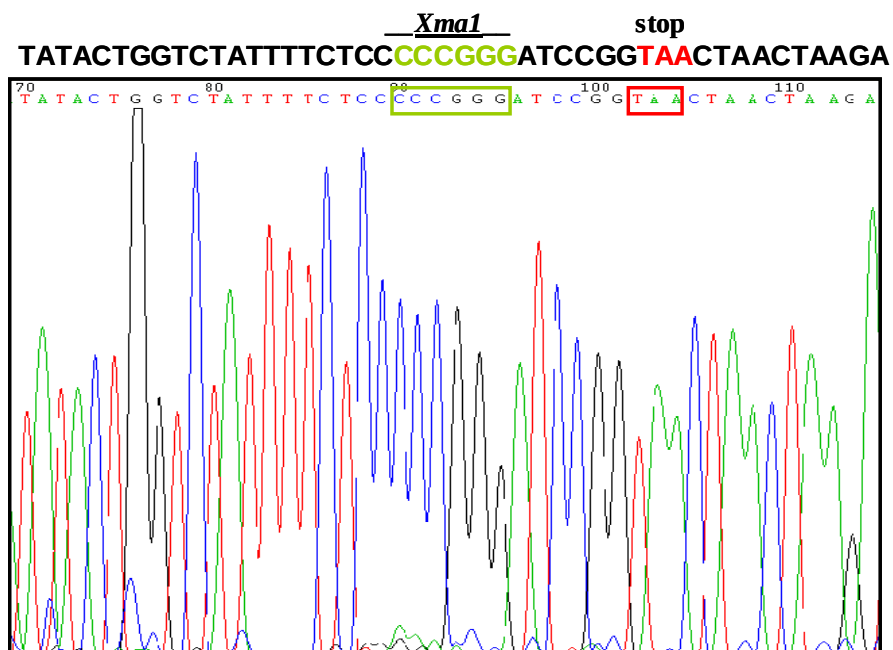


XIV. Apéndice II

Electroferograma del extremo 5' del fragmento $\rho 1$ clonado en el plásmido pIVEX2_{2,4d}

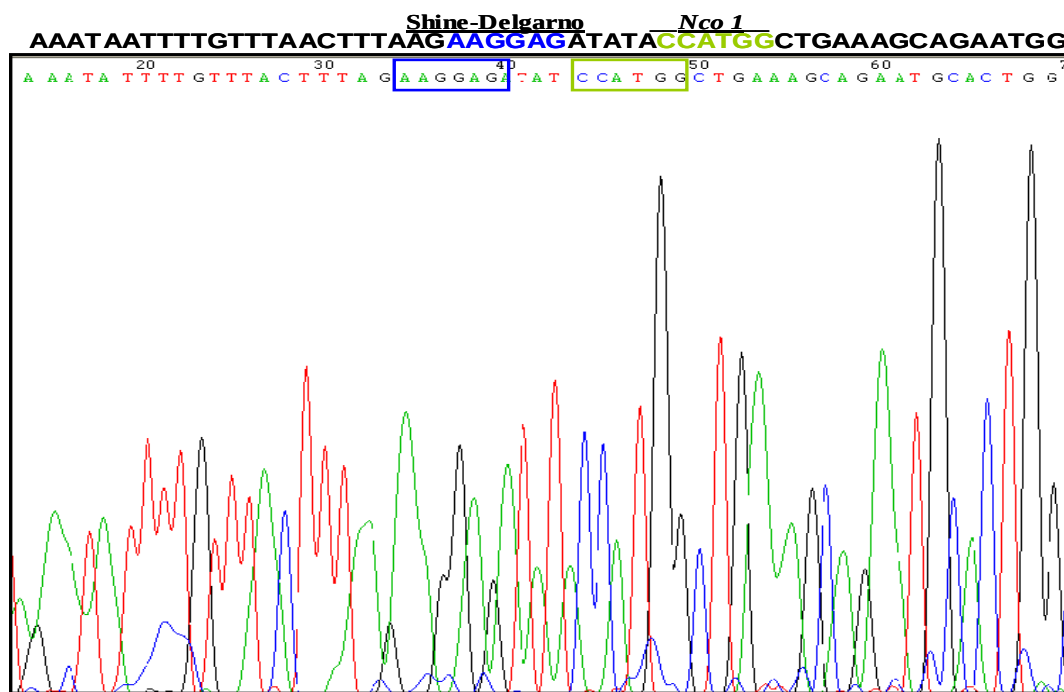


Electroferograma del extremo 3' del fragmento $\rho 1$ clonado en el plásmido pIVEX2_{2,4d}



XV. Apéndice III

Electroferograma del extremo 5' del fragmento $\rho 1NH_2$ clonado en el plásmido pIVEX2_{2,3}d



Electroferograma del extremo 3' del fragmento $\rho 1NH_2$ clonado en el plásmido pIVEX2_{2,3}d

