

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

# "EXPRESIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR GABA ρ1 EN CÉLULAS Sf9"

Tesis que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias (Neurobiología) presenta MVZ. Miriam Edith Amaro Lara

> Director de Tesis Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Campus Juriquilla, Querétaro 2009



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: Miriam Edith Amaro Lara, cuyo título es: "Expresión funcional del receptor GABA p1 en células Sf9" 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 la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

<b>-</b>	Firma
Presidente	
Dr	
Secretario (Tutor)	
Dr	
Vocal	
Dr.	
Questo esta	
Supiente Dr	
DI	
Suplente	
Dr	

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán Coordinadora del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

#### RESUMEN

GABA p1 se distribuye principalmente en la vía visual del sistema nervioso central, en estructuras como la retina y el colículo superior; en donde la participación del receptor parece estar dirigida hacia la modulación de la información excitatoria. Sin embargo, aún falta conocer más sobre las interacciones que tiene GABA p1 con otras subunidades y su estructura molecular detallada. Para dilucidar aspectos de esta naturaleza, es conveniente sobreexpresar dicha proteína en un sistema que facilite la producción de grandes cantidades de la misma y realice modificaciones post-traduccionales.

El presente trabajo se dirigió a la sobreexpresión de GABA p1 en células de insecto Sf9, utilizando una construcción Baculovirus/GABA p1 que contenía el marco abierto de lectura del receptor y una etiqueta 6 His. Se infectaron células Sf9 con sobrenadantes virales, se determinó la presencia de GABA p1 en el DNA viral y la identificación de los transcritos correspondientes, en diferentes horas post-infección y utilizando diversas multiplicidades de infección. Sin embargo, al tratar de inmunolocalizar la proteína mediante Western *blot* y realizar estudios electrofisiológicos en ovocitos de rana Xenopus laevis invectados con RNA o membranas plasmáticas de células Sf9 infectadas, los resultados fueron negativos. Se recurrió a la secuenciación nucleotídica de la construcción viral y del plásmido, mostrando la presencia de una deleción puntual que desplazó el marco de lectura. Por esta razón, a pesar de ser adecuada tanto la propagación del virus como la transcripción, no se puede concluir si el sistema baculovirus/células Sf9 es eficiente o no, para la expresión funcional de GABA p1, lo cual se sigue planteando como una perspectiva.

#### ABSTRACT

The GABA p1 receptor is distributed mainly in the visual pathway in the central nervous system, in structures such as retina and superior colliculus. In these areas, this receptor modulates the excitatory signalling. However, little is known about its molecular structure. To learn more about its detailed structure it is necessary to overexpress the receptor in a system capable of yielding large amounts of protein and to generate postranslational modifications.

We tried to overexpress GABA  $\rho$ 1 with a baculovirus carrying the open reading frame and tagged with 6 His. We infected Sf9 cells with a viral stock and determinated the presence of the receptor in the viral DNA and also identified the corresponding mRNA transcripts, at several times and multiplicity of infection. However, the results were negative when we tried to immunolocalizated GABA  $\rho$ 1 by either Western blot or electrophysiological assays in *Xenopus laevis* oocytes injected with RNA or plasma membranes of infected Sf9 cells. After sequencing several viral stock and plasmid, we identified a single site deletion that displaced the open reading frame. Even though there was a good viral propagation and appropriate transcription, we can not conclude if the Baculovirus/Sf9 cells is efficient or not for the functional expression of GABA  $\rho$ 1. Therefore, more studies will be necessary to probe or discard this system as a suitable tool to overexpress this receptor.

## AGRADECIMIENTOS

#### Tutor

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

# **Comité Tutoral**

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez Y en su momento a la Dra. Irma Alicia Martínez Dávila

## Jurado de Examen

Dr. Edgar Philip Heimer de la Cotera Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco Dr. Ataúlfo Martínez Torres Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez Dra. Ana María Sifuentes Rincón

## Personal de apoyo en nuestro laboratorio

Investigador Asociado Dr. Lenin David Ochoa de la Paz Técnico Académico M. en C Ángeles Edith Espino Saldaña Auxiliar de laboratorio Lic. Efrén Ruíz Alcibar

# Compañeros de laboratorio

Abraham, Argel, Arturo, Berenice, Christian, Esteban, Fernando, Gustavo, Néstor, Patricia, Paul, Teresa, Adriana, Alejandra, Daniel, Jazmín y Salomé.

**Compañera** Lluviana Rodríguez Vidal

**Unidad de Enseñanza** M. en C. Leonor Casanova Rico

**Trámites académicos** Yolanda Orduña Cruz

**Unidad de Proteogenómica** Dra. Anaid Antaramián Salas

#### Instituto de Fisiología Celular UNAM

Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez Técnico Académico M. en C. Alicia Sampieri

#### **Biblioteca**

MVZ Román Pacheco Barrita Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz Lic. Rafael Silva Cruz Ignacio Caballero Navarro Lic. José Ángel Salazar Muro

# Cómputo

M. en C. Alberto Lara ISC Omar González H.

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.** Becario No. 232109

# Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

Becario No. 400008840

#### DEDICATORIA

Dedico el esfuerzo del presente trabajo a mi mamá, la Sra. Socorro Lara Nieto, por entregarme todo lo que es, por darme ejemplo de perseverancia y arrojo, por su apoyo incondicional y por demostrar ganas de vivir.

A mi papá, el Sr. Jorge Amaro Orozco, quien a pesar de su ausencia física ha sido un incentivo de muchas formas para mejorar mi desempeño personal.

A mis hermanas Nancy, Cristina y Angélica porque siempre han estado en íntima cercanía conmigo, cualquiera que fuese mi situación y por hacer patente el amor que me tienen.

A mis hermanos Jorge, Javier, Guillermo y Gaspar por las diferentes formas de apoyarme y estar a mi lado.

A mis sobrinos (as), y cuñados (as) por su amor y atenciones.

A Evaristo Iván Valdés Bautista por toda la comprensión y por la reciprocidad en el amor. Por todo lo que implicó la distancia de por medio. Te amo.

A mis "Osos" por demostrarme que aún en la brevedad de la vida, es preciso ser feliz.

Dedico a todos y cada uno de ustedes, no el trabajo tangible en sí mismo, sino el esfuerzo que ha implicado mi formación académica y más aún, por demostrarme con su ejemplo que hay posibilidades de ser mejor persona.

A todos ustedes, mi familia, quienes siempre estarán en mi vida, porque en resumen nos une el amor que nos tenemos.

Los amo.

# ABREVIATURAS

AcMNPV	Virus de polihedrosis de la multinucleocápside de Autographa		
	californica		
3- APA	Ácido 3-aminopropil fosfínico		
3- APMPA	Ácido 3-aminopropil metil fosfinico		
ASIC	Canal iónico sensible a pH ácido		
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato y nitroazul tetrazolium		
BSA	Albúmina sérica bovina		
CACA	Ácido cis-4-amino crotónico		
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio		
CAMP	Ácido cis-2 aminometil ciclopropanocarboxílico		
Ca(NO3)₂	Nitrato de calcio		
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario		
CPE	Capa plexiforme externa		
CPI	Capa plexiforme interna		
DEPC	Dietilpirocarbonato		
dNTP's	Deoxirribonucleótidos trifosfato		
E. coli	Escherichia coli		
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético		
EGTA	Ácido etilenglicoltetracético		
ERG	Electrorretinograma		
GABA	Ácido gamma aminobutírico		
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico		
GFP	Proteína verde fluorescente		
I4AA	Ácido acético 4 imidazol		
HEL	Línea celular de eritroleucemia megacarioblástica humana		
HEK	Línea celular de riñón de embrión humano		
HCI	Ácido clorhídrico		
hr	Regiones homólogas		
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactosido		
KCI	Cloruro de potasio		
LB	Luria Bertani		
MgSO₄	Sulfato de magnesio		

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PEG	Polietilenglicol
PI	Postinfección
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
Sf9	Spodoptera frugiperda
SNC	Sistema nervioso central
STC-1	Línea celular de tumor de células neuroendócrinas intestinales
	de ratón
TACA	Ácido trans 4 amino crotónico
ТАМР	Ácido trans 2 aminometil ciclopropanocarboxilico
TBS	Tris salino amortiguado
TEMED	Tetrametiletilenediamina
THIP	4,5,6,7, tetrahidroisoxazol 5,4 pyridin (gaboxadol)
TNM-FH	Trichoplusia ni Medium-Formulation Hink
ТРМРА	Ácido metilfosfinico 1,2,5,6 tetrahidropiridin 4
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UV	Ultravioleta
X. laevis	Xenopus laevis

# UNIDADES DE MEDICIÓN

Å	Amstrong
Α	Amperios
°C	Grados centígrados
g	Gravedades
kDa	Kilodaltones
mg	Miligramo
μl	Microlitro
ml	Mililitro
μm	Micrómetro
μ <b>Μ</b>	Micromolar
mM	Milimolar
ΜΟΙ	Multiplicidad de infección
mV	Milivoltios
n	Número de muestra
nA	Nanoamperios
pb	Pares de bases
pfu/cél	Unidades formadoras de placa por célula
pfu/ml	Unidades formadoras de placa por mililitro
v	Voltios

# ÍNDICE TEMÁTICO

# **1 INTRODUCCIÓN**

- 1.1 Ácido gamma aminobutírico (GABA)
- 1.2 Receptores a GABA
  - 1.2.1 Receptores metabotrópicos
  - 1.2.2 Receptores ionotrópicos
    - 1.2.2.1 Los receptores GABA<sub>A</sub>
    - 1.2.2.2 Los receptores  $GABA_C$
- 1.3 Estructuras anatómicas donde se expresa el mRNA y/o la proteína GABA
- ρ1
- 1.4 Papel fisiológico de GABA p1

# **2 ANTECEDENTES**

- 2.1 Sistemas de expresión de proteínas
  - 2.1.1 Sistemas libres de células
  - 2.1.2 Sistemas procariotas
  - 2.1.3 Sistemas eucariotas
    - 2.1.3.1 Células de mamíferos
    - 2.1.3.2 Ovocitos de Xenopus laevis
    - 2.1.3.3 Levaduras
    - 2.1.3.4 Baculovirus/ células Sf9
- 2.2 Características de los baculovirus
  - 2.2.1 Ciclo de infección natural de los baculovirus
  - 2.2.2 Baculovirus/células Sf9 como sistema de expresión de proteínas
    - 2.2.2.1 Estudios realizados con los receptores GABA<sub>A</sub> en el sistema baculovirus/células Sf9

# **3 JUSTIFICACIÓN**

# **4 HIPÓTESIS**

# **5 OBJETIVO GENERAL**

# 6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

# **7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

# **8 MATERIALES Y MÉTODOS**

- 8.1 Localización del sobrenadante con las partículas virales de interés
  - 8.1.1 Propagación de células Sf9
  - 8.1.2 Infección de cultivos celulares
  - 8.1.3 Extracción de DNA viral
  - 8.1.4 PCR para amplificar GABA p1 y regiones que flanquean dicha secuencia
- 8.2 Experimentos con diferentes multiplicidades de infección (MOI) y horas PI
  - 8.2.1 Ensayo en placa
  - 8.2.2 Infección de cultivos celulares
  - 8.2.3 Extracción de DNA viral e identificación mediante PCR de GABA
  - ρ1
  - 8.2.4 Extracción de RNA
  - 8.2.5 Transcripción reversa y PCR para amplificar GABA p1.
- 8.3 Inmunolocalización de GABA p1 en las membranas de las células Sf9 infectadas
  - 8.3.1 Transfección de células HEK 293
  - 8.3.2 Aislamiento de membranas de células Sf9
  - 8.3.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS
  - 8.3.4 Western blot
- 8.4 Experimentos para determinar la funcionalidad de la proteína en la membrana celular
  - 8.4.1 Inyección de membranas y RNA de células Sf9 infectadas en ovocitos de rana *Xenopus laevis*
- 8.5 Verificación de la secuencia del DNA viral
  - 8.5.1 Ensayo en placa y selección de las clonas virales
  - 8.5.2 PCR del DNA viral proveniente de las clonas virales
    - 8.5.2.1 PCR de la región ubicada río arriba de GABA ρ1 (Fragmento 1)

8.5.2.2 PCR de la región ubicada río abajo de GABA p1 (Fragmento 2)

8.5.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

8.5.4 Ligación del producto de PCR en el vector pGEM®-T Easy

8.5.5 Transformación de bacterias *E. coli* cepa XL1-Blue

8.5.6 Resiembra de colonias seleccionadas

8.5.7 Purificación de DNA plasmídico (preparación en pequeña escala)

8.5.8 Confirmación mediante PCR de la presencia de GABA p1 en el DNA plasmídico

8.5.9 Secuenciación del DNA amplificado a partir de las clonas virales y del plásmido pGEM®-T Easy

## 9 RESULTADOS

9.1 Localización del sobrenadante adecuado para realizar las infecciones

9.1.1 Propagación e infección de células Sf9

9.1.2 Confirmación mediante PCR de la secuencia de GABA p1 y regiones flanqueantes

9.2 Experimentos con diferentes multiplicidades de infección (MOI) y horas PI

9.2.1 Obtención del título viral del sobrenadante utilizado en las infecciones

9.2.2 Confirmación de la presencia de GABA ρ1 en el DNA viral extraído con las diferentes MOI

9.2.3 Confirmación de la transcripción de GABA p1

9.2.4 Registro de ovocitos inyectados con RNA o membranas

9.2.5 Inmunolocalización de la proteína GABA ρ1 en las membranas de las células Sf9 infectadas

9.2.5.1 Expresión de GABA p1-GFP en células HEK 293

9.2.5.2 Visualización de las proteínas de membrana en gel desnaturalizante e inmunolocalización de GABA p1 mediante *Western blot* 

9.3 Verificación de la secuencia del DNA viral

9.3.1 Determinación de la presencia de GABA p1 en las clonas seleccionadas

9.3.2 Determinación de la presencia de los Fragmentos 1 y 2.

9.3.3 Verificación de la ligación de GABA p1 en pGEM®-T Easy

9.3.4 Secuenciación de DNA y del plásmido pGEM®-T Easy

10 DISCUSIÓN

**11 CONCLUSIONES** 

**12 PERSPECTIVAS** 

**13 REFERENCIAS** 

14 LISTA DE FIGURAS

15 LISTA DE TABLAS

16 APÉNDICE DE SOLUCIONES DE TRABAJO

ÍNDICE

	Página
Introducción	1
Antecedentes	11
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivos	25
Estrategia experimental	26
Materiales y métodos	27
Resultados	49
Discusión	62
Conclusiones	62
Perspectivas	62
Referencias	63
Lista de figuras	73
Lista de tablas	75
Apéndices de soluciones de trabajo	76

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Ácido gamma aminobutírico (GABA).

Los neurotransmisores inhibidores activan canales de cloruro y potasio, de esta forma desencadenan el flujo iónico a través de la membrana plasmática produciendo la hiperpolarización de la misma. Este evento hace más difícil que las señales excitatorias despolaricen la membrana plasmática de la neurona, teniendo como consecuencia la imposibilidad de generación de un potencial de acción (Kandel et al., 2000; Alberts et al., 2004).

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibidor más abundante en el encéfalo de mamíferos adultos (Silvilotti et al., 1991). La síntesis de este neurotransmisor está dada por la acción de la enzima, descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Kandel et al., 2000). Las dos isoformas de esta enzima son la GAD 65, la cual es sintetizada en las terminales nerviosas y la GAD 67 localizada en cuerpos celulares y dendritas (Soghomonian et al., 1998).

#### 1.2 Receptores a GABA.

Los receptores a los cuales tiene afinidad el neurotransmisor GABA, fueron clasificados de acuerdo con sus características estructurales y farmacológicas, de la siguiente manera:

1.2.1 Receptores metabotrópicos: son los GABA<sub>B</sub> los cuales se consideran heterodiméricos por estar constituidos por las subunidades GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub>. Están acoplados a proteínas G, cuentan con siete regiones transmembranales y están regulados por sistemas intracelulares de segundos mensajeros que le permiten regular el paso de calcio y potasio (Figura 1). Son receptores que se activan con baclofeno y no responden a los moduladores de GABA<sub>A</sub> (Bettler y Tiao, 2006; Blein et al., 2000; Bowery, 1989; Huang, 2006; Kaupmann et al., 1997).



**Figura 1. Receptor metabotrópico GABA**<sub>B.</sub> Regulan el paso de calcio y potasio mediante sistemas acoplados a proteínas G.

- **1.2.2 Receptores ionotrópicos**: son los GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>; dichos receptores presentan cuatro pases transmembranales y los dominios amino y carboxilo están ubicados en la región extracelular. Son canales iónicos heteropentaméricos que al ser activados por ligandos como GABA permiten el paso del ión cloruro (Olsen et al., 1990; Olsen y Sieghart, 2008; Olsen y Sieghart, 2009; Polenzani et al., 1991; Simon, 2004; Strata et al., 1994). Para los fines de este estudio, es pertinente abundar en las características de ambos receptores.
  - 1.2.2.1 **Receptores GABA**<sub>A</sub>: están conformados por las subunidades:  $\alpha$  1-6,  $\beta$ 1-3, y 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  (Davies et al., 1997; Garret et al., 1997; Olsen y Sieghart, 2008; Simon, 2004). Los dos subtipos de receptores de GABAA más abundantes, están constituidos de la siguiente forma: el primero consisten en dos subunidades  $\alpha_1$ , dos  $\beta_2$  y una  $\gamma_2$  (**Figura 2**); el segundo, en una subunidad  $\alpha_2$ , una  $\alpha_3$ , dos  $\beta_3$  y una  $\gamma_2$  (McKernan y Whiting, 1996). Al parecer, estos receptores necesitan de la presencia de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  para ser funcionales; mientras que, en sistemas heterólogos se pueden formar homómeros funcionales (Martínez-Torres y Miledi, 2004; Miko et al., 2004). Los moduladores positivos de estos barbitúricos, benzodiacepinas, receptores son los las los neuroesteroides y el etanol; mientras que sus antagonistas son la bicuculina y la picrotoxina (Bormann 1988; Doble et al., 1992; Mcdonald et al., 1994; Olsen et al., 1990) (Tabla 1).



Figura 2. Receptor ionotrópico GABA<sub>A.</sub> Receptor pentamérico, cuya composición principal está dada por dos subunidades  $\alpha_1$ , dos  $\beta_2$  y una  $\gamma_2$ .

Tabla 1 PROPIEDADES FUNCIONALES Y FARMACOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS A GABA.<br/>(Bormann, 2000; Doble et al., 1992; Enna et al., 1997; Mcdonald et al., 1994; Olsen et al., 1990).

	GABA <sub>A</sub>	GABA <sub>C</sub>	
Subunidades	α, β,γ, δ, ε, π <b>y</b> θ	ρ1, ρ2 y ρ3	
Agonistas	TACA (potente), Muscimol (potente), Zolpidem	,TACA (potente), Muscimol (parcial),	
	Isoguvacina, I4AA, THIP, TAMP.	CACA (parcial), I4AA, Isoguvacina,	
	Moduladores: barbitúricos, benzodiacepinas	,CAMP, TAMP, Glicina, β- alanina.	
	neuroesteroides, etanol.	Moduladores: 5α esteroides	
		(concentraciones altas)	
Antagonistas	Bicuculina (unión competitiva).	TPMPA (potente), 3- APA	
	Picrotoxina (unión no competitiva).	(competitivo), Picrotoxina (unión	
		competitiva), 3-APMPA, I4AA,	
		Isoguvacina, THIP.	
		Moduladores: neuroesteroides,	
		zinc.	
Tiempo de apertura	25 A 30 ms	25 A 30 ms 150 a 200 ms	
Desensibilización	Rápida	Lenta	
EC <sub>50</sub>	5-100 μM	1-4 Mm	

3- APA	Ácido 3-aminopropil fosfinico	I4AA	Ácido acético 4 imidazol
3- APMPA	Ácido 3-aminopropil metil fosfinico	TACA	Ácido trans 4-amino crotónico
CACA	Ácido cis-4-amino crotónico	TAMP	Ácido trans 2 aminometil ciclopropanocarboxílico
CAMP	Ácido cis 2 aminometil ciclopropanocarboxílico	THIP	4,5,6,7,tetrahidroisoxazol 5,4 pyridin (gaboxadol)
TPMPA	Ácido metilfosfínico 1,2,5,6-tetrahidropiridin 4		

1.2.2.2 Receptores GABA<sub>c</sub>: son complejos heteroméricos entre las subunidades ρ1, ρ2 y ρ3 que dan lugar a receptores pentaméricos (Enz y Cutting, 1999) (Figura 3). Se caracterizan por poseer una sensibilidad a GABA 10 veces mayor que los receptores GABA<sub>A</sub> (Qian et al., 1993; Woodward et al., 1992, 1993). Los receptores GABA<sub>C</sub> son insensibles a la bicuculina y al baclofeno (Johnston, 1996; Polenzani et al., 1991). Sus agonistas principales son: el ácido trans-4-amino crotónico (TACA), el muscimol y el ácido cis-4-amino crotónico (CACA); mientras que su antagonista principal es el ácido metilfosfinico 1,2,5,6-tetrahidropiridin-4 (TPMPA) (Abdel-Halim et al., 2008; Ragozzino et al., 1996).

Trabajos realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* sugieren que las subunidades  $\rho_2$  de rata no forman receptores homoméricos GABAc funcionales, sino que requieren de las subunidades  $\rho_1$  o  $\rho_3$  y para formar heterómeros (Zhang et al., 1995). Sin embargo, en las células HEK 293 transfectadas con el ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) de  $\rho_2$ , sí se registraron corrientes iónicas con la técnica de *Patch clamp*. Estos receptores homoméricos de  $\rho_2$  presentaron una sensibilidad incrementada a su agonista ácido cis-4-amino crotónico (CACA) y alta afinidad a la picrotoxina (Alakuijala et al., 2005). Además, tanto la subunidad  $\rho_2$  humana y bovina forman receptores homoméricos funcionales en ovocitos (Cutting et al., 1992; López-Chávez et al., 2005).

La región conservada entre las subunidades  $\rho$  de diferentes especies, incluye las dos terceras partes proximales de la región amino extracelular y los cuatro pases transmembranales, mientras que la menos conservada es el tercio distal amino terminal y el asa intracelular que va del pase transmembranal 3 al 4 (Zhang et al., 2001). En la **Figura 3** se muestra un esquema de la subunidad GABA  $\rho$ 1 basado en Zhang et al. (2001) y modificado por Alakuijala (2007).

Los receptores heteroméricos p<sub>1</sub>p<sub>2</sub> son la única combinación *in vivo* detectada hasta el momento, en células bipolares de retina (Enz y Cutting, 1999).



**Figura 3. Receptor ionotrópico GABA p1.** A Estructura propuesta para la composición del receptor GABA p1 (Wegelius, 2000). B Estructura de la subunidad del receptor GABA p1 basado en Zhang et al. (2001) y modificado por Alakuijala (2007). Aminoácidos que participan en la función del receptor, en donde H=Hisitidina, L=Leucina, N=Asparagina, P=Prolina, Q=glutamina, T=Treonina, Y=Tirosina.

# 1.3 Estructuras anatómicas donde se expresa el mRNA y/o la proteína GABA p1.

Se conoce que el ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de GABA  $\rho_1$  se expresa en retina humana (Cutting et al., 1991) y además en corteza cerebral (Enz y Cutting 1999), hipófisis (Boué-Grabot et al., 2000) colículo superior, hipocampo, cerebelo, médula espinal (Boué-Grabot et al., 1998; Enz et al., 1995; Enz y Cutting, 1999; Rozzo, 2002), ganglios de la raíz dorsal (Wegelius et al., 1998; Wegelius, 2000) y núcleo geniculado lateral de la rata (Alakuijala et al., 2006). En pollos se sabe que el mRNA de GABA  $\rho_1$  se expresa en el *tectum* óptico (Albrecht et al., 1997); mientras que en bovinos se expresa en retina (Polenzani et al., 1991), el núcleo caudado de los ganglios basales, puente, cerebelo, hipófisis y cuerpo calloso (López-Chávez et al., 2005). Fuera del sistema nervioso central (SNC) el mRNA de GABA  $\rho_1$  se ha localizado en las células intestinales neuroendócrinas tumorales de ratón, de la línea denominada como STC-1 (Jansen et al., 2000), además se ha identificado en hígado, corazón y testículos de rata (Buoé-Grabot et al., 1998; Li et al., 2008).

Por otra parte se evidenció la expresión de la proteína GABA p1 mediante inmunohistoquímica en el hipocampo adulto, colículo superior, núcleo geniculado lateral (Alakuijala et al., 2007), núcleo dorsal del vago, núcleo del tracto solitario (Milligan et al., 2004), capa gris superficial, núcleo del tracto óptico, núcleo terminal dorsal, medio y lateral de la rata; mientras que en el bovino se localizó su expresión en núcleo caudado de los ganglios basales y el tallo cerebral (López-Chávez et al., 2005, Rosas-Arellano et al., 2007).

#### 1.4 Papel fisiológico de GABA ρ1.

El papel fisiológico de p1 no es del todo comprendido, ya que es una subunidad de descubrimiento reciente; sin embargo, se sabe que se encuentra en la retina (Cutting et al., 1991) específicamente en las células bipolares (Lukasiewicz et al., 2004; Lukasiewicz y Shields, 1998). Para .ubicar el contexto en el que se encuentra GABA p1, se mencionará a grandes rasgos la composición de la retina.

Las señales generadas en los fotorreceptores (conos y bastones) son transmitidas a los conos bipolares y bastones bipolares, llamadas así de acuerdo con el fotorreceptor con el que tienen contacto. La información de los conos bipolares pasa a las células ganglionares, sin embargo, la señal que se envía a las células ganglionares depende de la naturaleza de los conos bipolares ya que son denominadas ON si las células despolarizan en presencia de luz y OFF si hiperpolarizan. Los bastones bipolares, no hacen sinapsis con las células ganglionares directamente sino con las amacrinas y estas a su vez con las ganglionares; las cuales envían las señales a los centros visuales mediante el nervio óptico (Masland 2001; Yang, 2004).

La información transmitida se modula con la participación de las células horizontales ubicadas en la capa plexiforme externa (CPE) y por las células amacrinas ubicadas en la capa plexiforme interna (CPI), en ambos casos se consideran neuronas GABAérgicas. Las neuronas glutamatérgicas son los fotorreceptores, las células bipolares y las células ganglionares. En el caso de las células bipolares, estas reciben

entradas de los fotorreceptores y de las células horizontales de la CPE. Las células bipolares y amacrinas hacen sinapsis con las células ganglionares en la CPI (Yang, 2004) **Figura 4**.



**Figura 4. Diagrama de la retina.** En la CPE las células horizontales reciben entradas de los fotorreceptores y proveen la retroalimentación negativa a los conos. Las células bipolares reciben entradas de ambos fotorreceptores y de las células horizontales (Recuadro 1). En la CPI las células bipolares y amacrinas proveen entradas a las células ganglionares (Recuadro 2) (Yang, 2004). EP epitelio pigmentado, SEF segmento exterior de fotorreceptores, CNE capa nuclear externa, CPE capa plexiforme externa, CNI capa nuclear interna, CPI capa plexiforme interna, CCG capa de células ganglionares, CFN capa de fibras nerviosas, HC célula horizontal, PR fotorreceptor, BC célula bipolar, AC célula amacrina, GC célula ganglionare.

Los receptores GABA<sub>C</sub> han sido localizados en las terminales presinápticas de las células bipolares y pueden ser activados con una concentración menor que la necesaria para activar a los receptores GABA<sub>A</sub> ubicados en los procesos sinápticos de las células ganglionares y en las terminales de las células bipolares.

La participación de los receptores GABA<sub>C</sub> genera una retroalimentación negativa que se da lugar en concentraciones más bajas, incluso que la mínima necesaria para activar a los GABA<sub>A</sub>. Además, la retroalimentación es más prolongada que si solo estuvieran presentes los receptores GABA<sub>A</sub>. Es probable que los receptores GABA<sub>C</sub>, en las terminales presinápticas de las células bipolares medien el ambiente en intensidades de penumbra, mientras que los receptores GABA<sub>A</sub>, ubicados en el espacio postsináptico, intervengan en la modulación de intensidades de brillo (Lukasiewicz y Shields, 1998).

Para estudiar la participación de los receptores GABA<sub>C</sub> se utilizaron ratones en los que se anuló la expresión de la subunidad p1 (McCall et al., 2002). Estos animales fueron utilizados para realizar electrorretinograma (ERG) y así determinar diferencias electrofisiológicas generadas por la deficiencia de los receptores GABA<sub>C</sub>. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los registros de la onda  $\alpha$  (función del segmento externo de los bastones); ni en la onda  $\beta$  (función de los bastones bipolares), sin embargo, una vez aislados los potenciales oscilatorios se observó, por efecto de la onda  $\beta$ , un incremento en número y amplitud en los ratones knock-out. Lo que es indicio de una reducción en la inhibición de los bastones bipolares de la terminal axonal, incrementando la transmisión a las neuronas retinales de tercer orden (Lukasiewicz et al., 2004).

Los receptores GABA<sub>C</sub> además de localizarse en retina, se expresan en estructuras subcorticales del sistema visual (Boué-Grabot et al., 1998; Frazao et al., 2007; Rozzo et al., 2002; Wegelius et al., 1998). Una de las estructuras donde se ha estudiado su expresión es el colículo superior; ejemplo de ello, es la realización de ratones knock-out de GABA  $\rho$ 1 y registros electrofisiológicos de *Patch clamp*. En esta área se evidenció que la inhibición está alterada pero no se elimina, a diferencia de los resultados obtenidos en retina, donde la inhibición de la expresión de GABA  $\rho$ 1 tiene como consecuencia la supresión de la expresión de los receptores GABA<sub>C</sub>. Por esta razón, se considera que GABA  $\rho$ 1 posee sistemas distintos de regulación en retina y en colículo superior (Schlicker et al., 2009). Además, la regulación de las subunidades GABA  $\rho$ 1 y GABA  $\rho$ 2 en esa misma estructura es independiente entre ellas, sin interferir la experiencia visual adquirida (Jost et al., 2006).

Se ha localizado la expresión GABA p1 en otros sistemas; ejemplo de ello, es su expresión en las células mitrales del bulbo olfatorio, sin conocer aún la forma exacta en la que intervienen en el proceso de transmisión de las señales olfatorias (Chen et al., 2007). También se conoce de la expresión de la subunidad p1 en la médula espinal del ratón y en los ganglios de la raíz dorsal. En este sistema, GABA p1 parece modular la información sensorial. Para corroborar esta información se eliminó la expresión de GABA p1 en ratones y se verificó la ausencia de la proteína a nivel de médula espinal; posteriormente se realizó una prueba nociceptiva con los filamentos de von Frey, en la que los individuos experimentales presentaron un umbral más bajo al dolor que los controles, con ello demuestran la participación de GABA p1 en la transmisión y modulación del dolor a nivel de médula espinal, aún sin saber el mecanismo específico de acción (Zheng et al., 2003).

#### 2 ANTECEDENTES

La subunidad p1 del receptor GABA<sub>C</sub> es una proteína integral de membrana, de la cual se conoce su secuencia nucleotídica. El gen que le codifica en humanos se ubica en el cromosoma 6 y su cDNA ha sido clonado (Cutting et al., 1991). Sin embargo, no se tiene la certeza de los mecanismos de ensamblaje de las subunidades, ni de los cambios conformacionales que se generan al ser activados. La concentración de GABA<sub>C</sub> en los tejidos, es insuficiente para realizar estudios estructurales; razón por la cual, se recurre a sistemas de expresión recombinante de genes. Por ello, es importante sobreexpresar la proteína en un sistema adecuado para realizar estudios de cristalografía y de difracción de rayos X que permitan tener un acercamiento a la estructura del receptor.

Debido a que existe una gran diversidad de sistemas, se debe elegir aquel que tenga un costo-beneficio más favorable de acuerdo a la proteína que se va a expresar. Por esta razón, la elección implica tener en cuenta que el sistema permita:

- a) Tener un promotor adecuado para sobreexpresar la proteína.
- b) Obtener transcritos estables y en concentraciones adecuadas.
- c) El direccionamiento del mRNA a los ribosomas y concentraciones suficientes de tRNA para realizar la traducción.
- d) El plegamiento correcto de la proteína y modificaciones postraduccionales.
- e) Transportar la proteína hasta el lugar donde lleva a cabo su función.
- f) Obtener una proteína funcional.
- g) Purificar las proteínas, especialmente aquellas que forman canales iónicos (Balbás et al., 2004).

#### 2.1 Sistemas de expresión de proteínas.

Los sistemas de expresión que han sido aplicados para expresar el receptor GABA p1 son diversos, algunos de ellos son: sistemas libres de células, procarióticos (*E. coli*), eucarióticos (líneas celulares de mamíferos, ovocitos de *X. laevis*, y levaduras).

Por otra parte se mencionarán características del sistema eucariótico baculovirus/células Sf9 como un posible sistema de expresión para GABA p1.

2.1.1 Sistemas libres de células: ofrecen la ventaja de no tener un sistema vivo de por medio, ya que consiste en un lisado de bacterias *E. coli* que contiene los componentes necesarios para realizar la transcripción y la traducción simultánea en presencia de un molde de DNA, mientras que una membrana semipermeable permite el intercambio continuo de sustancias (Spirin et al., 1988). En nuestro grupo de trabajo se realizó un proyecto encaminado a la producción de la subunidad p1 del receptor GABA<sub>c</sub> (solo eliminando el péptido señal) mediante el sistema de libre de células. A su vez y con el mismo sistema, se consideró expresar un fragmento de 259 aminoácidos que conforman el extremo amino del receptor sin el péptido señal. Esta segunda opción fue la que rindió resultados favorables obteniéndose la expresión del amino terminal de GABA p1, sin lograrse la expresión del receptor completo como se planteaba en el primer caso. La falta de expresión de GABA p1 fue atribuida a inestabilidad durante el proceso de traducción, ya que es probable que en los segmentos transmembranales, los residuos con carácter hidrofóbico expuestos a un ambiente acuoso presenten cambios estructurales, de tal forma, que los grupos no polares se orienten de forma distinta y den lugar a una proteína inestable con un plegamiento inadecuado o que en principio se vea afectada su síntesis. (López, 2007).

**2.1.2 Sistemas procariotas:** En nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo la expresión de 259 aminoácidos correspondientes al extremo amino del receptor GABA  $\rho$ 1 en *E. coli.* ER2566 logrando la inducción de la proteína con distintas concentraciones de IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactosido). Sin embargo, este sistema no lleva a cabo modificaciones postraduccionales, lo que le resta viabilidad para ser utilizado como un sistema de sobreexpresión para proteínas de membrana de origen eucariótico, de las que se tengan por expectativa realizar estudios estructurales (Leija, tesis en proceso).

#### 2.1.3 Sistemas eucariotas:

2.1.3.1 Células de mamíferos: si bien, la proteína que se desea expresar es

de origen eucariótico, las líneas celulares de mamífero pueden contener sistemas de autorregulación que le impiden sobreexpresarla, o la expresión misma de la proteína puede ser tóxica para la célula (Eifler et al., 2007), limitando de esta forma los niveles de expresión.

Se han realizado ensayos de expresión del receptor GABA p1 en células HEK 293, mediante transfección de plásmidos (Wegelius et al., 1996), esto implica que, para obtener cantidades elevadas de la proteína, es preciso realizar de manera continua el procedimiento. Para el caso de GABA p2, que también se expresó en la misma línea celular, las características electrofisiológicas del receptor fueron distintas de las reportadas para los receptores nativos (Alakuijala et al., 2005).

**2.1.3.2** Ovocitos de *X. laevis*. La proteína GABA p1 ha sido expresada en múltiples ocasiones en ovocitos de *X. laevis* mediante la inyección de RNA proveniente de la transcripción *in vitro* del cDNA de GABA p1. La expresión de esta proteína está enfocada en diversos propósitos, como: determinar la participación de distintos aminoácidos en la modulación catiónica (Calvo et al., 1994; Chang et al., 1995), por mecanismos de óxido-reducción (Calero y Calvo, 2008) y por esteroides (Morris et al., 1999). También se ha expresado GABA p1 para determinar su afinidad a anestésicos (Belelli et al., 1999) y flavonoides (Goutman et al., 2003) y para conocer los efectos antagónicos del ácido fosfínico (Krehan et al., 2003), la picrotoxina (Qian et al., 2005) y del bilobalide (Huang et al., 2006). Por otra parte, se ha expresado para dilucidar la formación de receptores heteroméricos con las subunidades GABA p1 y p2 (Pan et al., 2006) y en unión con GFP para ubicar a los receptores en la célula (Martínez-Torres y Miledi 2001).

La inyección de proteínas en el ovocito de *X. laevis* es un sistema de expresión ampliamente utilizado para estudios funcionales; sin embargo, la cantidad de proteína por ovocito es baja considerando el proceso que debe darse a cada ovocito previo a ser inyectado y además el periodo de sobrevivencia del mismo, una vez que se fue utilizado. Por tal razón, se

considera un sistema adecuado para expresión funcional pero no para sobreexpresar a GABA p1 con perspectivas hacia un estudio estructural.

2.1.3.3 Levaduras: en nuestro grupo de trabajo se sobreexpresó GABA p1 en levaduras Saccharomyces cerevisiae las cuales fueron transformadas con el plásmido pYEXp1-GFP. En estas levaduras se determinó la expresión de mRNA y posteriormente se comprobó la expresión de la proteína mediante Western blot utilizando un anticuerpo primario dirigido contra la proteína verde fluorescente (GFP). En otros casos, se utilizó anticuerpo dirigido hacia el amino terminal de GABA p1 en células sin permeabilizar, lo que permitía atribuir la localización del receptor en la membrana. Además, se realizaron ensayos destinados a determinar la funcionalidad; los cuales consistieron en inyectar el mRNA y membranas de las levaduras en ovocitos de rana X. laevis. Las corrientes registradas en los ovocitos inyectados con membranas tuvieron amplitudes pequeñas, de tan sólo 5 a 7 nA que se generaron con una concentración de GABA de 1mM. Ante dicho resultado, se sugirieron tres explicaciones: en principio, que los receptores no eran abundantes en la membrana plasmática de la levadura, que en gran medida los receptores no son ensamblados de forma adecuada o que la membrana plasmática del ovocito no puede incorporar las membranas de las levaduras de forma tan eficiente como lo hace con otras membranas eucarióticas (Martínez -Martínez et al., 2004).

**2.1.3.4 Baculovirus/células Sf9:** El Virus de Polihedrosis de la Multinucleocápside de *Autographa californica*, (AcMNPV) recombinante es un sistema ampliamente utilizado para expresar diversas proteínas al infectar células de tejido ovárico de pupa de *Spodoptera frugiperda* (Sf9).

A la fecha, este sistema aún no ha sido probado para sobreexpresar el receptor GABA ρ1, razón por la cual, se abundará respecto a las características del virus, ciclo de infección natural y posteriormente en el uso del sistema baculovirus/células Sf9, para la expresión de proteínas.

## 2.2 Características de los baculovirus.

Los baculovirus son una familia de virus de DNA de cadena doble circular, generada mediante enlaces covalentes (Murharmer, 2007). Están exentos de secuencias no codificantes y el DNA se encuentra superenrrollado y empacado en la nucleocápside (Okano et al., 2006). Son patógenos en insectos, predominantemente de los órdenes Lepidóptera, Himenóptera y Díptera. (Murharmer, 2007).

De acuerdo con la morfología de los cuerpos de inclusión se han dividido en dos géneros: nucleopolihedrovirus, los cuales producen grandes cuerpos de inclusión que contiene varios viriones ( $0.5 - 1.5 \mu$ M de diámetro) y en granulovirus, los cuales producen pequeños cuerpos de inclusión ( $0.16 - 1.5 \mu$ M) que generalmente contienen un virión y sólo afectan a lepidópteros (Okano et al., 2006).

Los baculovirus cuentan con dos tipos de orígenes de replicación:

- Regiones homólogas (*hr*): son secuencias repetidas que además de fungir como sitios de orígenes de replicación actúan también como potenciadores transcripcionales. En el AcMNPV las *hr* contienen cerca de 70 pb con una sección palíndrome imperfecta cercana al centro de 30 pb (Piljam et al., 2004). Las regiones homólogas tiene ocho sitios los cuales son: hr1, hr1a, hr2, hr3, hr4a, hr4b, hr4c, hr5, las cuales se ejemplifican en la Figura 5 (Okano et al., 2006) con 2 a 8 repeticiones en cada sitio.
- No hr. son orígenes de replicación que aparecen conforme se incrementa el número de pases seriales; las deleciones en estos sitios, resultan en recombinaciones con estabilidad alta del virus y de la producción de la proteína (Okano et al., 2006).



**Figura 5**. **Diagrama del genoma del AcMNPV.** Se muestran las regiones homólogas (*hr*) representadas con círculos y un número en su interior que indica las repeticiones presentes. Además, se indica el porcentaje del genoma en el que se encuentra ubicado a lo largo de sus 133 849 pb (Okano et al., 2006).

# 2.2.1 Ciclos de infección natural de los baculovirus.

La infección por baculovirus consiste en dos ciclos:

Infección primaria. Las partículas virales entran al tracto digestivo vía oral mediante la ingesta de los cuerpos de inclusión, los cuales son disueltos en pH alcalino a nivel intestinal, generando la liberación de los viriones (Okano et al., 2006), posteriormente infectan los enterocitos mediante la fusión de la envoltura de la partícula viral con la membrana plasmática de la célula y posteriormente se trasladan al núcleo, donde se libera el DNA. Este ácido nucleico se replica aproximadamente 6 h después de la infección, tiempo a partir del cual, las partículas virales se ensamblan en el núcleo de manera consecutiva (Murphy et al., 2000). Las nucleocápsides de los nucleopolihedrovirus, por ejemplo del AcMNPV, son ensambladas en el núcleo y expulsadas hacia el citoplasma cubiertas en membrana nuclear, subsecuentemente obtienen su envoltura final de la membrana plasmática que fue modificada previamente por la proteína de fusión viral, esto sucede para el caso de virus no ocluidos; mientras que los viriones incorporados en los cuerpos de inclusión obtienen su envoltura únicamente de la membrana nuclear (Okano et al., 2006) (Figura 6).

Infección secundaria. Las progenies virales que se generan durante la fase tardía de infección son las partículas virales no ocluidas; siendo estas, las responsables de la infección secundaria a través de procesos de endocitosis, permitiendo la diseminación de la infección en las células intestinales de la larva. El AcMNPV genera infecciones diseminadas en lepidópteros, no así en dípteros e himenópteros (Okano et al., 2006).

Por otra parte, las partículas virales ocluidas se producen durante la fase de infección muy tardía y generan cuerpos de inclusión (polihedras) que se acumulan en los núcleos de las células del animal durante el proceso de infección (**Figura 6**). Estos cuerpos de inclusión son liberados al momento de la lisis celular y finalmente la desintegración de la larva deja los cuerpos de inclusión expuestos al medio ambiente para iniciar un nuevo ciclo de infección. Cabe hacer mención que los cuerpos de inclusión tienen como componente principal a la polihedrina; esta proteína tiene como función mantener reunidos cientos de partículas virales para protegerlas de la inactivación proteolítica, la cual es ocasionada por la descomposición del tejido del hospedero y de diversos agentes ambientales (Murphy et al., 2000).

Respecto a la ruta y eficiencia de infección se ha observado que los virus no ocluidos son altamente infecciosos en cultivos celulares y menos eficientes para el caso de infecciones vía oral, siendo esta relación de carácter inverso para el caso de los virus ocluidos (Okano et al., 2006).



Figura 6. Infecciones primarias y secundarias generadas por baculovirus en un ambiente natural. Esquema modificado de Lua L, BioEngineering - Baculovirus Picture Book The University of Queensland, Australia. 2003 http://www.cheque.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Baculovirus/Baculo\_pict urebook.html.

# 2.2.2 Baculovirus/células Sf9 como sistema de expresión de proteínas.

El sistema de expresión de los baculovirus, toma ventaja de las características de la polihedrina; ya que es una proteína que se expresa en niveles altos y no es necesaria para los eventos de infección y replicación. Es por ello que se utiliza su promotor y se reemplaza su secuencia genética por el gen de interés (Murphy et al., 2000). El promotor es seguido al menos, de un sitio de restricción para insertar el gen de interés, quedando flanqueado por secuencias virales.

El DNA viral y el plásmido que contiene el gen de interés, son cotransfectados en las células de insecto, acto seguido, se lleva a cabo una recombinación homóloga entre los dos elementos cotransfectados, de tal forma que la secuencia de interés es insertada en el genoma viral, excluyendo la secuencia del gen de la polihedrina (Murphy et al., 2000).

El sistema de expresión de baculovirus ha sido ampliamente utilizado para expresar una variedad de proteínas de localización citoplasmática, proteínas secretadas y asociadas a la membrana plasmática. Este último caso es de nuestro interés debido a la ubicación de GABA p1, por lo que a continuación se mencionarán algunos ejemplos de sobreproducción de proteínas de membrana:

- Trogadis et al. (1995) expresaron el receptor de dopamina D1 en células Sf9 y determinaron que se internalizaba una vez que era activado por su agonista.
- En otro estudio realizado por Chen et al. (1996) sobreexpresaron el receptor de trombina para abordar sus propiedades de desensibilización, además, concluyeron que las características electrofisiológicas del receptor se conservan, ya que presentan similitudes con los receptores generados en sistemas de expresión de mamíferos como la línea celular de eritroleucemia megacarioblástica humana (HEL).
- El sistema baculovirus/células Sf9 también ha sido de utilidad para expresar proteínas de plantas, tal es el caso del canal de potasio AKT1, el cual se encuentra ubicado en las raíces de *Arabidopsis thaliana;* dicho receptor se expresó para estudiar sus propiedades bioquímicas. En primera instancia se expresó en *E. coli* sin obtener resultados satisfactorios, razón por la cual, recurrieron al sistema baculovirus/células Sf9 (Daram et al., 1997).
- Qian et al. (2000) mostraron que es posible expresar el receptor opiode humano μ (HμOR) en células Sf9. Obtuvieron 100 veces más proteína en comparación con los niveles endógenos (Cote et al., 1993). La afinidad por sus agonistas y antagonistas se conservó respecto de los receptores expresados en células de mamíferos, además de acoplarse funcionalmente a proteínas G (Wang et al., 1994).
- > Por otra parte, este sistema ha sido de utilidad en el estudio de la formación de

monómeros y oligómeros del receptor colinérgico muscarínico M<sub>2</sub>, el cual fue purificado a partir de células Sf9 (Park et al., 2003).

Es pertinente resaltar los estudios en los cuales se expresaron proteínas de membrana en el sistema baculovirus/células Sf9 y de las que se realizaron estudios estructurales. Ejemplo de ello es el canal denominado acuaporina 2 humana, el cual, se encuentra implicado en problemas cardiacos congestivos y en dificultades de regulación hídrica renal. Esta acuaporina se produjo en gran escala, logrando obtener 1.6 mg de la proteína por litro de cultivo, con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.05 pfu/cél (Werten et al., 2001). Dicha expresión fue adecuada para la generación de un cristal, con él, se obtuvo la estructura con una resolución de 4.5 Å en el plano de la membrana.

Este mismo sistema, permitió expresar un canal iónico sensible a pH ácido (ASIC) denominado como canal de sodio activado por protones, voltaje independiente. Este canal se ha visto implicado en la percepción del dolor, mecanosensación, aprendizaje y memoria. A partir de la expresión de la proteína en las células Sf9 se obtuvo la cristalización de la proteína y la estructura se resolvió en 1.9 Å; además, se logró su caracterización electrofisiológica (Jasti et al., 2007).

Por otra parte, se expresó el receptor β2 adrenérgico en células Sf9. Dicho receptor reside principalmente en músculo liso y está asociado con enfermedades como el asma, hipertensión y falla cardiaca. (Taylor, 2007). Se obtuvo la cristalización y la estructura se resolvió en 2.4 Å, en interacción con su agonista carazolol (Cherezov et al., 2007).

# 2.2.2.1 Estudios realizados con los receptores $GABA_A$ en el sistema baculovirus/células de insecto.

Se han realizado diversos estudios con el sistema baculovirus/células Sf9, en el que se han descrito algunas propiedades funcionales del receptor GABA<sub>A</sub>.

Atkinson et al. (1992) realizaron dos construcciones con el baculovirus, una de ellas con cDNA de la subunidad GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 y la otra con GABA<sub>A</sub>  $\beta$ 1, en ambos casos de bovino. Con dichas construcciones realizaron coinfecciones en células de insecto Sf21. De acuerdo con los resultados obtenidos de los estudios electrofisiológicos y de inmunodetección, concluyen que los receptores pueden
llegar a la membrana 18 h PI ya sea como homómeros o heterómeros, teniendo propiedades farmacológicas distintas.

El estudio realizado por Birnir et al. (1992) en el cual realizaron dos construcciones virales, una con la subunidad GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 y otra con GABA<sub>A</sub>  $\beta$ 1, no se registraron corrientes cuando se expresaban en cultivos celulares distintos. Sin embargo, cuando se infectaron células Sf9 con ambos sobrenadantes virales, se obtuvieron corrientes en respuesta a la presencia de GABA (100 µM) en la solución de baño, con ello concluyen que, al menos en lo que refiere a estas dos subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, sólo es posible expresarlos en forma de heterómeros. Por otra parte, los ensayos de inmunocitoquímica en los que las células eran coinfectadas con las dos subunidades, los receptores se ubicaron en la membrana plasmática, mientras que por separado  $\alpha$ 1 no lograba transportarse hasta dicho lugar, concluyendo así que,  $\beta$ 1 es importante para el transporte de  $\alpha$ 1 y con ello generar receptores heteroméricos en la membrana y además funcionales. La razón por la cual no encuentran homómeros funcionales a diferencia de Atkinson et al. (1992), aún no es determinada.

Posteriormente, Joyce et al. (1993) realizaron una transfección estable con DNA plasmídico, utilizando el promotor IE-1 de AcMNPV para expresar GABA<sub>A</sub>  $\beta$ 1 y los resultados fueron corroborados mediante estudios electrofisiológicos. Es importante destacar que, en las células Sf9, generalmente la formación de sellos es más propicia para el registro de corrientes iónicas, aún estando infectadas, en comparación con las células Sf21. Lo anterior puede atribuirse a que la superficie de las células Sf9 es más lisa, de acuerdo a estudios de microscopia electrónica realizados con ambas líneas celulares (King et al., 1992)

Westh-Hansen et al. (1997) realizaron mutaciones en la subunidad GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 de una isoleucina por una valina en la región amino y lo expresan en conjunto con las subunidades GABA<sub>A</sub>  $\beta$ 2 y  $\gamma$ 2 en el sistema baculovirus/células Sf9. Mediante estudios electrofisiológicos se determinó que las corrientes que se registraban en receptores con esta mutación eran diez veces más pequeñas comparadas con aquellos que no presentaban mutación.

Yamashita et al. (1999) transfectan células Sf9 con baculovirus que

21

contenían cDNA de cada subunidad utilizada en el estudio, para posteriormente realizar coinfecciones y generar los siguientes receptores heteroméricos GABA<sub>A</sub>:  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ . En ellos se probó el isofluorano, el cual es un anestésico volátil y el hexafluorodietil éter como agente convulsivante. En principio concluyen que las subunidades GABA<sub>A</sub>  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  y  $\beta 2$  no generan receptores homoméricos con ello, determinan la afinidad a cada componente dependiendo de las subunidades de las que esté conformado.

Por su parte, Dalziel et al. (2000) investigaron los efectos de la mutación de la leucina ubicada en la posición 9' en el segundo pase transmembranal de las subunidades GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 y  $\beta$ 1 por fenilalanina, tirosina y alanina. Los receptores fueron expresados en el sistema baculovirus/células Sf9 y de acuerdo a estudios electrofisiológicos, se determinó que este aminoácido es importante para el flujo de la corriente.

Ratra et al. (2001) determinaron que la toxicidad generada por el bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> debida a insecticidas como el endosulfán, lindano y fipronil es selectiva. Para llegar a esta conclusión realizaron construcciones en baculovirus con diferentes subunidades de GABA<sub>A</sub> ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 6,  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 y  $\gamma$ 2) transfectando o infectando células Sf9. Con ello pueden destacar la participación de la subunidad GABA<sub>A</sub>  $\beta$ 3 en la toxicidad selectiva.

Los estudios de Englomb et al. (2002) sugieren que una glicina 219 ubicada en el pase transmembranal 1 en la subunidad GABA<sub>A</sub>  $\beta$ 2, es crítico para su desensibilización y el efecto de anestésicos inyectados como pentobarbital y propofol.

Smith et al. (2003) probaron diferentes concentraciones de THIP, también llamado gaboxadol en células Sf9 que previamente infectaron con baculovirus para que expresaran el receptor GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2. Con ello determinaron que dicha sustancia actúa como agonista o como inhibidor dependiendo de la concentración del mismo.

Lindquist et al. (2005) estudian la interacción de GABA y la gabazina en diferentes concentraciones y tiempos. La gabazina actúa como inhibidor competitivo en receptores GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 2 y GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 $\beta$ 1, los cuales fueron

22

expresados en células Sf9. Sus experimentos concluyen en determinar las concentraciones de gabazina que simulan inhibiciones tónicas y fásicas.

De manera más reciente, en nuestro grupo de trabajo se utilizó el sistema baculovirus/células Sf9 para expresar la proteína GABA p1. Para lo cual, se realizó una doble transfección con la construcción viral, la cual cuenta con el promotor de polihedrina, los sitios de recombinación, una etiqueta de seis histidinas y un epítopo V5 y con el plásmido de entrada pENTR™/D-TOPO Invitrogen ® que contenía el inserto de GABA p1 (pENTR/D-TOPO p1), el cual procede de una biblioteca genómica de cDNA de retina humana y que fue clonado en primera instancia en pBluescript II KS (Calvo et al., 1994). El sobrenadante obtenido de la transfección fue denominado como pase uno y se utilizó para reinfectar y obtener un sobrenadante con un título mayor. Una vez que se llevaron a cabo las infecciones de los cultivos, se realizaron ensayos de PCR que determinaron la presencia del DNA viral que contenía a GABA p1; no obstante, se requieren pruebas que determinen de manera contundente que este sistema es apto para la sobreexpresión, purificación y funcionalidad de la proteína.

#### **3 JUSTIFICACIÓN**

Los baculovirus han emergido como un sistema apto para la sobreexpresión de distintas proteínas en células eucariotas (Murharmer, 2007). Ejemplo de ello fueron los estudios mencionados en el capítulo anterior, en los que ha sido posible la expresión funcional de receptores de membrana (Chen et al., 1996; Cote et al., 1993; Daram et al., 1997; Park et al., 2003 Trogadis et al., 1995). Otras proteínas de membrana han sido cristalizadas y su estructura se ha resuelto a partir de la utilización de este sistema de expresión. Esto nos habla de que es un sistema apto para la producción de cantidades adecuadas de la proteína (Cherezov et al., 2007; Jasti et al., 2007; Werten et al., 2001). Más aún, existen reportes en los que específicamente se ha expresado el receptor GABA<sub>A</sub> con diversas combinaciones de sus subunidades, en el sistema baculovirus/células Sf9. Los estudios electrofisiológicos, en su gran mayoría, Patch clamp de célula completa, han permitido dilucidar las propiedades del receptor en diversas circunstancias, ya sea para probar el efecto de diversos fármacos; o bien, para determinar la función de ciertos aminoácidos que parecen ser de importancia para la función del receptor como activación y desensibilización del mismo (Atkinson et al., 1992; Birnir et al., 1992; Dalziel et al., 2000; Englomb et al., 2002; Joyce et al., 1993; Lindquist et al., 2005; Ratra et al., 2001; Smith et al., 2003; Westh-Hansen et al., 1997; Yamashita et al., 1999). Por tales razones, se considera que el sistema baculovirus/células Sf9 puede ser apropiado para la expresión de GABA p1.

# 4. HIPÓTESIS

La proteína del receptor GABA p1 conservará sus propiedades funcionales al expresarse en un sistema baculovirus/células Sf9.

# 5. OBJETIVO GENERAL

Expresar en forma funcional GABA p1en el sistema heterólogo baculovirus/células Sf9.

# 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar mediante ensayo en placa, la multiplicidad de infección del baculovirus-GABA ρ1.

2) Confirmar la presencia de la secuencia GABA ρ1 en las partículas virales mediante PCR.

3) Confirmar la presencia de los transcritos de GABA p1.

4) Corroborar la expresión de GABA p1 mediante Western blot.

5) Analizar la función del receptor GABA ρ1, producido en el sistema de baculovirus mediante técnicas de electrofisiología.

#### 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



#### 8 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 8.1 Localización del sobrenadante con las partículas virales de interés

#### 8.1.1 Propagación de células Sf9.

La línea celular Sf9 es derivada de tejido ovárico de pupa de *Spodoptera frugiperda* y se propaga en medio suplementado completo de Grace o también denominado *Trichoplusia ni* Medium-Formulation Hink (TNM-FH) **(Tabla 2).** Este medio se adicionó con antimicótico y antibióticos referidos en la **Tabla 3**. La apariencia de estas células es esférica y granular, aunque en algunos casos pueden observarse fusiformes **(Figura 7).** Una de sus principales ventajas es que pueden crecer en monocapa y en suspensión, razón por la cual, el cultivo puede llevarse a gran escala (Murhammer, 2007). En cultivos adherentes se utilizó una dilución 1:5 (volumen de células: volumen final de medio) y se mantuvo en fase logarítmica de crecimiento. Para cultivos en suspensión se realizó el pase al alcanzarse una densidad de 2.0 a 2.5x10<sup>6</sup> células/ml para diluirse y tener una densidad inicial de 1x10<sup>6</sup> células/ml (Invitrogen ®).

DENOMINACIÓN DEL MEDIO	ADITIVOS	FINES DE USO
Medio de Grace suplementado	Lactoalbúmina hidrolizada	Propagación
completo.	Extracto de levaduras	
(TNM-FH completo).	10% de suero fetal bovino	
	(SFB)	
	5% de SFB	Infección
	100 μM Ganciclovir (sólo	
	durante los tres primeros	
	nases)	
Modio do Graco po		Congolación
	L-yiutamina	Congelacion
suplementado		

Tabla 2.	CONSIDERA	CIONES Y	USOS DEL	MEDIO DI	E CULTIVO.

# Tabla 3. ANTIMICÓTICO Y ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN EL MEDIO DE<br/>CULTIVO.

	CONCENTRACIÓN DE TRABAJO	MÉTODO DE ACCIÓN
Anfotericina β	0.25 μg/ml	Se une a esteroles e interfiere con la permeabilidad de la membrana.
Penicilina	100 U/ml	Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana.
Estreptomicina	100 μg/ml	Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas



**Figura 7. Células Sf9 sin infectar**. **A** Fotografía tomada con objetivo 20X, **B** Fotografía tomada con objetivo 40X.

#### 8.1.2 Infección de cultivos celulares.

En primera instancia fue necesario seleccionar el sobrenadante que contenía las partículas virales portando GABA p1, razón por la cual, se realizaron infecciones de cultivos adherentes en cajas de 35 mm de diámetro y con una confluencia aproximada del 70%. El volumen de cada sobrenadante con el que se infectaron los cultivos fue de 15 µl. Se incubaron durante 3 días a 27°C, tiempo necesario para generar un mayor número de partículas virales en caso de estar contenidas en el sobrendante y así tener mayores posibilidades de obtener DNA viral. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se colectaron 750µl de sobrenadante para extraer el DNA viral.

#### 8.1.3 Extracción de DNA viral.

Se realizaron extracciones de DNA de los sobrenadantes probados en los cultivos adherentes obtenidos 72 h PI.

- Se adicionaron 750µl de Polietilenglicol (PEG) 8000 en 1M NaCl. Posteriormente se mezclaron por inversión y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min.
- Se centrifugaron a 12 000 X g 10 min para sedimentar las partículas virales.
- Luego de retirar el medio y dejar sólo las pastillas, se agregaron 100 μl de amortiguador de lisis (0.1% Tritón X-100 en PBS) y se homogenizaron asegurando lavar las paredes de los tubos.
- Se adicionaron 10 μl de proteinasa K (5 mg/ml) y se mezclaron gentilmente por inversión para posteriormente incubarlas 1 h a 50°C.
- Posteriormente se agregaron 110 μl fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezclaron gentilmente invirtiendo el tubo. Luego de este procedimiento, se centrifugaron 12 000 X g 5 min a temperatura ambiente.
- Al terminar el periodo de centrifugación, se transfirieron las fases acuosas a tubos nuevos. En ellos se agregaron 10 µl de acetato de sodio 3M, 10 µg de glucógeno y 250 µl de etanol absoluto. Cada sobrenadante fue incubado a -20°C al menos durante 20 min.
- Finalizada la incubación se centrifugaron 12 000 X g 15 min 4°C, las pastillas se lavaron con etanol al 70% y fueron centrifugados de nuevo con los mismos parámetros.
- Por último, se dejaron secar las pastillas y se resuspendieron en 40 µl de agua estéril.

## 8.1.4 PCR para amplificar GABA ρ1 y regiones que flanquean dicha secuencia.

La construcción viral que se utilizó en el presente trabajo, se llevó a cabo mediante la recombinación del Baculodirect de Invitrogen® y el clon de entrada pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO Invitrogen® que contenía el inserto de GABA  $\rho$ 1 (pENTR/D-TOPO  $\rho$ 1), el cual procede de una biblioteca genómica de cDNA de retina humana y que fue

clonado en primera instancia en pBluescript II KS (Calvo et al., 1994), dando como resultado la construcción que se muestra en la **Figura 8**.



**Figura 8. Mapa funcional del baculovirus**. En el que P<sub>PH</sub> representa la ubicación del promotor transcripcional de polihedrina; *att*R1 y *att*R2 los sitios de recombinación; GABA  $\rho$ 1 la secuencia del gen que codifica para la proteína de interés; el epítopo V5 y las 6 histidinas son etiquetas que permiten la localización de la proteína hacia su extremo carboxilo.

Para realizar un escrutinio acerca de la presencia del inserto de GABA p1 en el DNA viral, se llevó a cabo la PCR para verificar que las partículas virales contenían la secuencia nucleotídica completa de GABA p1 y además de las regiones flanqueantes. Para ello se utilizaron dos pares de oligonucleótidos cuyos productos abarcan los fragmentos marcados en la **Figura 9**. El primer par se muestra en la **Tabla 4** y fue utilizado para amplificar el gen de GABA p1 (Rho1 For y Rho1 Rev), obteniéndose un producto de 1419 pb; el segundo par amplificó un fragmento que abarcó las regiones que flanquean la secuencia nucleotídica de GABA p1 (PolyH y V5); es decir, desde la región del promotor de polihedrina hasta el epítopo de V5. Con este par de oligonucleótidos, mencionados en la **Tabla 4**, se obtuvo un producto amplificado de 1666 pb. Las condiciones bajo las cuales se amplificaron ambos productos son las mismas (**Tabla 5**), al igual que las concentraciones de los reactivos utilizadas en cada reacción de PCR (**Tabla 6**).



**Figura 9. Fragmento amplificado de GABA p1 y regiones flanqueantes.** Producto amplificado con oligonucleótidos de GABA p1 ubicados en las regiones marcadas con la flecha azul y fragmento que abarcan los oligonucleótidos que flanquean los sitios de recombinación con la flecha roja (promotor de polihedrina y epítopo V5).

# Tabla 4. OLIGONUCLEÓTIDOS DE GABA ρ1, POLIHEDRINA Y V5.

NOMBRE	SECUENCIA	DIRECCIÓN	LONGITUD (Pares de bases)
Rho1 For	CACCATGAGATTTGGCATCTTTCTT	Sentido	25
Rho1 Rev	GGAGAAAATAGACCAGTATATTAA	Antisentido	24
Poly	AAATGATAACCATCTCGC	Sentido	18
V5	ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT	Antisentido	21

# **Tabla 5**. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE GABA ρ1 Y DESDE EL PROMOTOR DE POLIHEDRINA HASTA EL EPÍTOPO V5.

	TIEMPO	TEMPERATURA	CICLOS
Desnaturalización inicial	5 min	95°C	1
Desnaturalización	45 s	94°C	
Alineamiento	1 min	52°C	25
Extensión	1.5 min	72°C	
Extensión final	10 min	72°C	1

# Tabla 6. REACTIVOS UTILIZADOS EN CADA ENSAYO DE PCR.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	
	FINAL	
10X Buffer Invitrogen ®	1X	
50 mM MgCl <sub>2</sub> Invitrogen ®	3 mM	
2.5 μM Oligonucleótido sentido Sigma®	200 nM	
2.5 μM Oligonucleótido antisentido Sigma®	200 nM	
10 mM Deoxinucleótidos trifosfato Sigma®	200 µM	
Taq Polimerasa 5 U/μΙ	1.25 U	
100 ng de DNA en un volumen total de 25 μl		

#### 8.2 Experimentos con diferentes multiplicidades de infección (MOI) y horas PI.

#### 8.2.1 Ensayo en placa.

Una vez que se tuvieron cultivos confluentes, se realizaron ensayos en placa, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante Baculodirect Invitrogen ®. Este procedimiento permitió hacer un conteo de las placas con la finalidad de calcular el título viral (número de partículas virales/ml), así como la multiplicidad de infección (MOI) (número de partículas virales/célula) **(Figura 10).** 

En primera instancia, se infectaron cultivos celulares adherentes con 1 ml de cada una de las diluciones décuples seriadas del sobrenadante viral (desde 10-3 hasta 10<sup>-7</sup>) con una n=3. Las diluciones se realizaron en medio de Grace suplementado completo con 5% de SFB y las células Sf9 fueron incubadas durante 3 h con las diluciones virales correspondientes. El sobrenadante viral utilizado se denominó P2 debido a que es una reserva de alto título viral proveniente de una segunda reinfección. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio de infección y se agregó el de plaqueo. Este medio esta constituido por una parte de agarosa al 2% y una de medio de Grace suplementado completo 2x con 15% de SFB, alcanzando un volumen final de 2 ml para cada pozo. Cuatro días después de iniciado el ensayo en placa, se colocó una segunda capa con rojo neutro (1mg/ml) disuelto en medio de Grace no suplementado y agarosa, esta última con una concentración final de 1% n=2. El colorante se agregó con la finalidad de identificar las células vivas las cuales incorporan el rojo neutro y rodean a las células muertas, haciendo visibles las placas de manera macroscópica. Esto permitió calcular el título viral al lograr contar las placas. Por otra parte, se realizaron ensayos con las mismas diluciones virales sin agregar el rojo neutro, ya que este colorante puede generar mutaciones en el DNA y estos experimentos estuvieron dirigidos a seleccionar las clonas virales que tuvieran el inserto de GABA p1.

TÍTULO VIRAL (pfu/ml)= <u>Número de placas</u> (Factor de dilución)(ml de inóculo)

INÓCULO REQUERIDO (ml)=  $\frac{\text{MOI (pfu/cél) x Número de células}}{\text{Título viral (pfu/ml)}}$ 

**Figura 10**. Título viral y MOI. Fórmulas utilizadas para calcular el título viral y la cantidad de inóculo requerido, de acuerdo a la MOI con que se requiere infectar.

#### 8.2.2 Infección de cultivos celulares.

Una vez que se determinó el sobrenadante viral que contenía el inserto, se realizaron las infecciones de los cultivos celulares con el sobrenadante viral P3 para lograr la expresión de GABA  $\rho$ 1. Se utilizaron MOI de 2.8, 4 y 10 pfu/cél en ensayos independientes y en tiempos que fueron desde 24, 48, 72 y 96 h.

Por otra parte, la densidad de los cultivos al momento de la infección fue ajustada a 2x10<sup>6</sup> células/ml de medio, se incubaron durante 3 h a 27°C con el medio y el sobrenadante viral requerido. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregó medio de Grace suplementado completo con 10% de SFB.

Se realizaron los conteos de viabilidad y se colectaron las siguientes muestras, una vez que se cumplieron los diferentes tiempos PI:

- 750 µl de sobrenadante para extraer el DNA viral.
- 1x10<sup>6</sup> células vivas para extracción RNA de células Sf9.
- 1x10<sup>7</sup> células vivas para obtención de membranas celulares.
  - Se separaba una de cuatro alícuotas como *stock* para de allí tomar muestra para inyectar ovocitos *X. laevis*.

#### 8.2.3 Extracción de DNA viral e identificación mediante PCR de GABA ρ1.

Se colectaron 750 µl de cada sobrenadante viral de cultivos infectados en diferentes tiempos postinfección (24, 48, 72 y 96 h) y con las diferentes MOI previamente mencionadas.

Se llevó a cabo el protocolo recomendado en el manual de manejo Baculodirect de Invitrogen®, el cual fue mencionado previamente en el apartado **8.1.3**; mientras que la PCR de GABA p1 se realizó de acuerdo a lo mencionado en el **8.1.4**.

## 8.2.4 Extracción de RNA.

Se extrajo el RNA total de 1 x 10<sup>6</sup> células Sf9 con diferente MOI y tiempos PI mencionados con anterioridad. La finalidad fue utilizar este ácido nucleico en la transcripción reversa y posteriormente en la PCR y con ello determinar la presencia de los transcritos provenientes del DNA viral.

Para la extracción se realizó el siguiente procedimiento (Chomczynski y Sacchi, 1987):

Se colocaron 3ml de solución D y se homogenizaron las muestras.

- Se agregaron 36  $\mu$ I de  $\beta$  mercaptoetanol por cada 5 ml de solución D.
- Por cada ml de solución D, se agregaron los siguientes reactivos, mezclando después de agregar cada uno de ellos:
  - o 100 μl de acetato de sodio 2M pH 4.
  - o 1 ml de fenol.
  - o 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico.
- Se mezclaron vigorosamente 10 seg y se incubaron 15 min en hielo.
- Después se centrifugaron 10 000 X *g* 40 min, 4°C. y las fases acuosas fueron transferidas a tubos nuevos.
- Posterior a ello, se adicionaron volúmenes iguales de isopropanol y se mezclaron para después incubarse por alrededor de 3 h en una temperatura de -20°C. Luego de esto, se centrifugaron con los parámetros antes mencionados.
- Se decantó el isopropanol y se agregaron 300 µl de solución D por cada ml de la misma solución utilizada en el primer paso.
- Las muestras se transfirieron a tubos de 2 ml, se mezclaron en vórtex y se agregó un volumen de isopropanol para cada muestra y así se incubaron 1 h a -20°C.
- Posteriormente, se centrifugaron 10 000 X g 30 min a 4°C, se descartaron los sobrenadantes y las pastillas se lavaron con etanol al 75%.

- Se centrifugaron nuevamente con los parámetros anteriores, se retiraron los remanentes de alcohol y las pastillas se dejaron secar.
- Por último, las pastillas se solubilizaron en agua con Dietilpirocarbonato (DEPC)
   y cada muestra se dividió en alícuotas para posteriormente almacenarse a -80°C.

## 8.2.5 Transcripción reversa y PCR para amplificar GABA ρ1.

Se realizó la transcripción reversa, tomando como molde RNA total de las células Sf9; fue así como se generó el cDNA que posteriormente se utilizó en experimentos de PCR.

La transcripción reversa se llevó a cabo en dos pasos. En primera instancia, la Mezcla I de reactivos que se muestra en la **Tabla 7** se incubó en el termociclador a 65°C durante 5 min, posteriormente las reacciones se colocaron en hielo y se agregó a cada una, la Mezcla II que se observa en la **Tabla 8**. Cabe hacer mención que la transcriptasa reversa se agregó al término del primer ciclo de 42°C por 2 minutos **(Tabla 9)** y finalmente se dejó transcurrir el resto del programa en el termociclador.

Tabla 7. MEZCLA I PARA TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	
	FINAL	
10 mM dNTP's Invitrogen ®	500 µM	
500 ng/µl Oligo (dT) Invitrogen ®	25 ng	
1 μg de RNA en un volumen total 13 μl		

## Tabla 8. MEZCLA II PARA TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	
	FINAL	
5X Amortiguador Invitrogen ®	1X	
10 mM DTT Invitrogen ®	1 mM	
Transcriptasa reversa 200U/µl (Invitrogen) ®	200 U	
En un volumen total de 7 µl		

GRADOS (°C)	DURACIÓN (min)
42	2
42	50
70	15

## Tabla 9. PROGRAMA PARA REALIZAR LA TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

Una vez terminada la transcripción revesa, el cDNA se dividió en alícuotas de 5 µl cada una, para posteriormente realizar la PCR y confirmar la obtención de los transcritos de GABA p1 mediante PCR como se mencionó en el apartado **8.1.4**.

# 8.3 Inmunolocalización de GABA ρ1 en las membranas de las células Sf9 infectadas.

## 8.3.1 Transfección de células HEK 293.

Se transfectaron células HEK 293 con la finalidad de incluir las membranas celulares como control positivo en la inmunodetección, en el *Western blot.* El DNA plasmídico utilizado para este procedimiento fue el pcDNA p1 GFP debido a que se pudo determinar la eficiencia de la transfección mediante la observación de la fluorescencia. El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

- 24 h previas a las transfección se realizó el pase, eliminando el uso de antibiótico y antimicótico. La confluencia se calculó de tal forma, que al día siguiente fuese del 70%.
- El día de la transfección se realizó la mezcla I mencionada en la Tabla 10 en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml y se incubaron a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó la mezcla II referida en la Tabla 11, en tubos independientes. Cabe hacer mención de que los controles se realizaron en cajas de 35 mm de diámetro y las muestras en cajas de 100 mm.
- Se reunieron los contenidos de las mezclas correspondientes y se incubaron por 15 min.

- Se retiró parte del medio de los cultivos celulares, de manera que las mezclas de transfección tuvieran una mayor probabilidad de entrar en contacto con las células.
- Se incubaron a 37°C durante 3 h, en las que cada 30 min se mezclaban de manera mecánica.
- Permanecieron en incubación por 48 h y se observaron al microscopio de epifluorescencia.
- Las células se desprendieron de forma mecánica, se cuantificaron y finalmente se almacenaron a -80°C hasta que se realizó el aislamiento de membranas.

	CONTROL	CONTROL DE	CONTROL	CONTROL	MUESTRAS
	NEGATIVO	LIPOFECTAMINA	DE DNA	POSITIVO	
Optimem	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	1000 µl
Gibco®					
Lipofectamina	_	10 µl	_	10 µl	50 µl

## Tabla 10. MEZCLA I PARA TRANSFECTAR CÉLULAS HEK 293.

## Tabla 11. MEZCLA II PARA TRANSFECTAR CÉLULAS HEK 293.

	CONTROL NEGATIVO	CONTROL DE LIPOFECTAMINA	CONTROL DE DNA	CONTROL POSITIVO	MUESTRAS
Optimem	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	1000 µl
Gibco®					
DNA	_		4 µg	4 µg	20 µg

#### 8.3.2 Aislamiento de membranas de células Sf9.

Una vez asegurada la presencia del DNA de GABA p1 en la partícula viral y el transcrito en las células Sf9 infectadas, se procedió a obtener las membranas y localizar en ellas a la proteína de GABA p1. Para ello, se colectaron  $1 \times 10^7$  células Sf9 de cada uno de los tiempos post-infección (24, 48, 72 y 96 h) con las diferentes MOI mencionadas (2.8, 4 y 10 pfu/cél) y se conservaron a -80°C. La lisis se realizó con homogenizador de teflón con 2ml de solución amortiguadora de glicina 200 mM (glicina 200 mM, NaCl 150 mM, EGTA 50 mM, EDTA 50 mM y sucrosa 300 mM) pH 9.0; además 20 µl de inhibidor de proteasas. Se centrifugó a 9,500 X *g* 15 min y el sobrenadante se ultracentrifugó 100 000 X *g* por 2 h. La pastilla se resuspendió en 100 µl de solución amortiguadora de glicina 5 mM, se dividió en alícuotas y se conservó a -80°C (Palma et al., 2003).

#### 8.3.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

Teniendo las membranas aisladas, se realizó la electroforesis de las mismas, en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes, dado que la proteína se espera en un rango de 47 kDa. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema de amortiguadores discontinuos (Sambrook et al., 2001).

En primer lugar, se realizaron los geles separadores, para cada cámara, con los reactivos que se indican en la **Tabla 12**, colocando hasta el final el persulfato de amonio y el TEMED en la mezcla total para evitar una polimerización prematura.

Se colocó el peine para generar los pozos y 30 min después, se agregó la mezcla para los geles concentradores (**Tabla 12**). Posteriormente se consideró un tiempo de 30 min para una adecuada polimerización.

Una vez polimerizado el segundo gel, las muestras se incubaron 5 min en agua a 95°C con previa mezcla de amortiguador de carga (Sambrook et al., 2001) y se sonicaron durante 10 segundos antes y después de calentar las muestras.

38

# Tabla 12. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE GELESDESNATURALIZANTES.

GEL SEPARADOR	VOLUMEN
	10 ml
Agua	3.3
Acrilamida	4.0
1.5 M Tris pH (8.8)	2.5
10% SDS	0.1
10% Persulfato de	0.1
amonio	
TEMED	0.004

GEL CONCENTRADOR	VOLUMEN	
	5 ml	
Agua	3.4	
Acrilamida	0.83	
1.5 m Tris pH (6.8)	0.63	
10% SDS	0.05	
10% Persulfato de amonio	0.05	
TEMED	0.005	

La electroforesis se realizó con 80 V hasta que el colorante rebasó el gel concentrador; posteriormente se incrementó a 110 V y se detuvo la electroforesis antes de que el frente se saliera del gel.

#### 8.3.4 Western blot.

Para permitir la inmunodetección de la proteína GABA ρ1 mediante *Western blot* en un rango aproximado de 47 kDa, se realizó el siguiente procedimiento:

- Se transfirieron los dos geles a las membranas de nitrocelulosa con 200 A durante 45 min. Una vez terminada la transferencia, los geles fueron separados y teñidos con azul de coomassie R 250 durante 2 h; posteriormente se agregó solución de desteñido por alrededor de 3 h, con cambios periódicos de la solución (Sambrook et al., 2001).
- Una de las membranas era incubada sólo con el anticuerpo secundario, de tal forma que se pudiera analizar la existencia de reconocimientos inespecíficos.
- Las membranas fueron incubadas con 20 ml de una mezcla de amortiguador de bloqueo Animal Free-Blocker 5X Vector Laboratories® diluido 1/5 en TBS sin Tween 20 durante 45 min en agitación.
- Se colocó el anticuerpo primario (Tabla 13) y se incubó en a 4°C durante 36 h.
- Se realizaron 3 lavados y se colocó el anticuerpo secundario (Tabla 14) durante

4 h a temperatura ambiente.

DIRECCIÓN	Nombre	ESPECIE EN QUE FUE
	Santa Cruz Biotechnology®	DESARROLLADO
Etiqueta de histidinas	H-15	Conejo
Región interna de p1	GABA <sub>A</sub> ρ1 (C-20)	Cabra
Región amino	GABA <sub>A</sub> ρ1 (N-19)	Cabra

## Tabla 13. ANTICUERPOS PRIMARIOS.

Dilución 1/1000 y preparados en 10 ml de TBS/Tween 0.1%.

#### Tabla 14. ANTICUERPOS SECUNDARIOS.

DIRECCIÓN	ESPECIE EN QUE FUE
Santa Cruz Biotechnology®	DESARROLLADO
Anti-IgG de conejo	Cabra
Anti-IgG de cabra	Conejo

Dilución 1/2000, marcados con fosfatasa alcalina y preparados en 10 ml de TBS/Tween 0.1%..

Se retiró el anticuerpo secundario y se lavó la membrana en tres ocasiones, por último se colocó 1 ml de solución de revelado BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato y nitroazul tetrazolium) Sigma®, la cual detecta de forma colorímetrica la actividad de la fosfatasa alcalina, dado que BCIP funciona como sustrato de la fosfatasa alcalina y el NBT al oxidarse da una coloración azul a las bandas de las proteínas identificadas.

8.4 Experimentos para determinar la funcionalidad de la proteína en la membrana celular.

8.4.1 Inyección de membranas y RNA de células Sf9 infectadas en ovocitos de rana *X. laevis.* 

Las ranas fueron anestesiadas mediante inmersión en agua con hielo, para posteriormente extraer los ovocitos. En primera instancia se removieron de manera mecánica la capa epitelial y la de células de la teca, consecutivamente fueron desfoliculados de manera enzimática, en colagenasa tipo I (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ I) diluida con solución Ringer, para luego agitarse gentilmente durante 30 min. Los ovocitos se lavaron 2 veces con solución Ringer y una con medio Barth; para finalmente incubarse en medio Barth a una temperatura de 16°C. Al día siguiente se inyectaron 50 nl de RNA (500 ng) o 50 nl de membranas (de aproximadamente 2x10<sup>6</sup> células) en el hemisferio vegetal. Tanto el RNA como las membranas, procedían de células Sf9 que habían sido infectadas con la construcción del baculovirus-GABA p1. Una vez inyectados los ovocitos, se incubaron en medio Barth a 16°C y fueron registrados de las 48 h a 72 h postinyección para el caso de los tratados con RNA; mientras que los inyectados con membranas se registraron a las 6 h postinyección. La concentración utilizada de GABA para el registro electrofisiológico fue de 0.1 mM a 1mM.

#### 8.5 Verificación de la secuencia del DNA viral.

#### 8.5.1 Ensayo en placa y selección de las clonas virales.

Se realizó un ensayo en placa de acuerdo a lo mencionado en el apartado **8.2.1** y posteriormente cada una de las placas virales fue seleccionada de la siguiente forma:

Se localizaron las placas en el medio con agarosa y fueron removidas con una punta para micropipeta de 200  $\mu$ l, posteriormente la punta se introdujo a un tubo con 1 ml de medio de Grace suplementado completo con 5% de SFB, para depositar el fragmento de agarosa y posteriormente mezclar con ayuda del *vórtex*.

Se tomaron 200 µl del medio para infectar cultivos celulares en placas de 6 pozos, con una densidad aproximada de 8 x 10<sup>5</sup>, en cada uno de ellos. Además se adicionó 1 ml de medio de Grace suplementado completo con 5% de SFB y se incubaron por alrededor de 1 h. Trascurrido ese tiempo se agregaron 800 µl más del medio de Grace suplementado completo con 10% de SFB y se dejaron en incubación a 27°C. Cada sobrenadante fue colectado cuando sólo quedaba el 10% de monoestrato adherido a la botella de cultivo celular, de tal forma que los sobrenadantes pudieran

41

contener el mayor número de partículas virales y así utilizarse en infecciones subsecuentes. Los tiempos de colecta variaron desde las 48 h hasta las 120 h PI.

#### 8.5.2 PCR del DNA viral proveniente de las clonas virales.

Para verificar la presencia del inserto de GABA p1 en las partículas virales, se realizaron extracciones de DNA de los sobrenadantes obtenidos a partir de las placas seleccionadas. Una vez obtenido el DNA viral como se especifica en el apartado **8.1.3** se verificaron las secuencias nucleotídicas de la construcción viral, en regiones cercanas al inserto de GABA p1.

#### 8.5.2.1 PCR de la región ubicada río arriba de GABA ρ1 (Fragmento 1).

El primer fragmento se encuentra localizado río arriba del inserto de GABA p1 (Figura 11) y los oligonucleótidos sintetizados (P1 Rho1 Forw y P1 Rho1 Rev) (Tabla 15) abarcaron un fragmento que está constituido por los siguientes elementos: el promotor de polihedrina, un sitio de recombinación y un segmento de la región 5' de GABA p1 abarcando un total de 519 nucleótidos (Fragmento P1). La mezcla de reactivos y los ciclos utilizados están mencionados en la Tabla 6 y Tabla 16 respectivamente.



**Figura 11 Amplificación de una región río arriba del inserto de GABA p1**. Localización del producto amplificado con oligonucleótidos, cuya ubicación se marcó con la flecha azul. El fragmento abarca el promotor de polihedrina, el sitio de recombinación y una región 5' de GABA p1.

#### **Tabla 15.** OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICAR DOS REGIONES: RÍO ARRIBA Y RÍO ABAJO DE GABA ρ1.

NOMBRE	SECUENCIA	DIRECCIÓN	LONGITUD (Pares de bases)
P1 For	AGTATTTTACTGTTTTCGTAACAG	SENTIDO	24
P1 Rev	TGGAAAAGACAGCCTCTCGT	ANTISENTIDO	20
P2 For	CCTCAGAGAGGAGCTCCCCA	SENTIDO	20
P2 Rev	CTTTCCATCCAACGACAAGCTTCAT	ANTISENTIDO	25

# **Tabla 16.** CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE GABA ρ1 EN LA REGIÓN 5'

	TIEMPO	TEMPERATURA	CICLOS
Desnaturalización inicial	5 min	95°C	1
Desnaturalización	45 s	94°C	
Alineamiento	1 min	55°C	25
Extensión	1 min	72°C	
Extensión final	5 min	72°C	1

#### 8.5.2.2 PCR de la región ubicada río abajo de GABA ρ1 (Fragmento 2).

El segundo producto amplificado se sintetizó a partir de los oligonucleótidos mencionados en la **Tabla 15** (P2 Rho1 Forw y P2 Rho1 Rev). El fragmento está conformado por nucleótidos ubicados en la región 3' de GABA p1 y elementos río abajo de este inserto como son: un sitio de recombinación, el epítopo V5, la etiqueta de seis histidinas, el codón de paro y parte de la secuencia nucleotídica del baculovirus, conteniendo en total 383 nucleótidos (Fragmento 2) (**Figura 12**). La mezcla de reactivos y los ciclos utilizados están mencionados en la **Tabla 6** y **Tabla 17**, respectivamente.



Figura 12. Amplificación de una región río abajo del inserto de GABA  $\rho$ 1. Localización del producto amplificado con oligonucleótidos, cuya ubicación se marcó con la flecha azul. El fragmento abarca una región 3' de la secuencia de GABA  $\rho$ 1, el sitio de recombinación, el epítopo V5, la etiqueta de seis histidinas, el codón de paro y parte de la secuencia del baculovirus.

# **Tabla 17.** CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE GABA ρ1 EN LA REGIÓN 3'

	TIEMPO	TEMPERATURA	CICLOS
Desnaturalización inicial	5 min	95°C	1
Desnaturalización	45 s	94°C	
Alineamiento	1 min	68°C	25
Extensión	30 s	72°C	
Extensión final	5 min	72°C	1

#### 8.5.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. de los productos de PCR, tanto de los que provenían de DNA viral como de aquellos que se originaron a partir del cDNA de células Sf9 infectadas. Se incidió luz UV para observar las bandas de DNA, las cuales se cortaron y de las que posteriormente se extrajo el DNA con el uso del kit GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit HE Healthcare®.

Se pesaron las bandas con agarosa correspondientes a los productos de PCR.

Se disolvió la agarosa de cada banda y se desnaturalizaron las proteínas con 10 µl de amortiguador de captura tipo 2 por cada 10 mg de gel. Se mezclaron por inversión para después incubarse a 60°C hasta que se disolviera la agarosa (aproximadamente 15 min, mezclando por inversión cada 3 min). Fueron transferidos 600 µl de muestra a cada columna (previamente incorporadas con su tubo colector), se incubaron a temperatura ambiente 1 min, se les dió un pulso de 13 000 x g 1 min y se descartaron los sobrenadantes. Este paso permitió la unión del DNA de las muestras a las columnas.

Se adicionaron 500  $\mu$ l de amortiguador de lavado tipo 1 a cada muestra y se centrifugaron 13 000 x *g* 1 min, se descartaron los sobrenandantes y se cambiaron los tubos colectores por tubos para microcentrífuga. El propósito de este procedimiento fue la remoción de sales y contaminantes de la membrana.

A cada columna se le agregaron 25 a 30  $\mu$ l de amortiguador de elusión, posteriormente se incubaron 1 min a temperatura ambiente y se centrifugaron 13 000 x *g* 1 min para recuperar el DNA y conservarse así a -30°C. Este paso permitió desprender el DNA de la columna y tenerlo resuspendido para su posterior uso.

#### 8.5.4 Ligación del producto de PCR en el vector pGEM®-T Easy.

Se utilizó el plásmido pGEM®-T Easy (Promega) con la finalidad de clonar productos de PCR, previamente purificados a partir de geles de agarosa. Dicho vector contiene timinas en ambos extremos, esto lo facilita la inserción dado que previene la recircularización, además es compatible con el uso de DNA polimerasas termoestables, las cuales adicionan adeninas, generándose así la ligación. Las regiones de clonación están flanqueadas por sitios de reconocimiento para algunas enzimas de restricción, siendo *Eco*RI la que se utilizó en estos ensayos.

Para llevar a cabo el protocolo de ligación, se procedió a la mezcla de los reactivos mencionados en la **Tabla 18**; todos ajustados a un volumen final 10 µl con agua desionizada. Estas muestras fueron incubadas durante un lapso aproximado de 16 h antes de ser utilizadas en el proceso de transformación de *E. coli*.

45

REACTIVOS	CONTROL	CONTROL	MUESTRA
	POSITIVO	NEGATIVO	
Amortiguador de ligación	5	5	5
Rápida (μl)			
pGEM®-T Easy (µl) (50 ng)	0.5	0.5	0.5
Producto de PCR (µl)	0	0	3
DNA control (µI)	2	0	0
T4 DNA ligasa (3 U/μl)	1	1	1
Agua desionizada (µl)	1.5	3.5	0.5

## Tabla 18. REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS REACCIONES DE LIGACIÓN.

## 8.5.5 Transformación de bacterias *E. coli* cepa XL1-Blue

- Las placas se expusieron a temperatura ambiente, previo a la realización del experimento, mientras se descongelaron las bacterias XL1-Blue en hielo.
- Se agregaron 5 µl de la reacción de ligación a los 50 µl de bacterias y se dejaron en incubación 30 min. Posteriormente se les realizó el choque térmico a 42°C durante 2 min y las muestras se regresaron al hielo
- Se agregaron 950 µl de medio líquido Luria Bertani (LB) y las muestras se incubaron 30 min a 37°C y posteriormente en la misma temperatura pero en agitación (80 rpm).
- Las muestras fueron centrifugadas 1000 X g 10 min a 4°C; siendo el sedimento el que se resuspendiera en 400 µl de medio LB líquido.
- En ambiente de esterilidad, se agregaron y distribuyeron los siguientes reactivos en la superficie de las placas de medio LB:
  - ο 200 μl de la mezcla de bacterias con reacción de ligación,
  - o 50 μl de X-Gal (50 mg/ml),
  - ο 20 μl de IPTG (0.1M).
- Se incubaron a 37°C durante 16 h, después se colocaron en refrigeración (4°C) para hacer evidente la diferencia entre colonias blancas y azules.

#### 8.5.6 Resiembra de colonias seleccionadas

Se eligieron 4 colonias de cada construcción y una para cada control (positivo y negativo).

Se agregaron 4 µl de ampicilina (50 mg/ml) a cada tubo con 4 ml de medio LB líquido. Posteriormente se eligieron las colonias blancas y se trasladaron cada una al tubo con medio LB líquido para después mezclarse y dejarse en agitación a 150 rpm 16 h.

#### 8.5.7 Purificación de DNA plasmídico (preparación en pequeña escala).

Cada tubo con crecimiento bacteriano, fue sedimentado en tubos para microcentrífuga de 2 ml, mediante dos eventos de centrifugación de 10 000 X *g* 1 min 4°C. Se procedió con el protocolo de lisis alcalina, según Sambrook et al. (2001).

Se agregaron 200 µl de solución l a los sedimentos, se mezclaron en *vórtex* y se incubaron 5 min a temperatura ambiente.

Se agregaron 200 µl de solución II, se mezclaron por inversión e incubaron en hielo durante 5 min.

Se adicionaron 200  $\mu$ l de solución III se mezclaron e incubaron en hielo 10 min para después centrifugarse 10 000 X *g* 10 min 4°C.

Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos, a los que se incorporaron 0.6 volúmenes de isopropanol puro, para luego mezclarse por inversión e incubarse 10 min a temperatura ambiente.

Las muestras fueron centrifugadas 10 000 X g 20 min 4°C. y los sobrenadantes fueron descartados con micropipeta.

A los sedimentos se les añadieron 500  $\mu$ l de etanol al 70%, se mezclaron con vórtex y se centrifugaron 10 000 X g 10 min 4°C.

Los sobrenadantes fueron descartados y las pastillas con el DNA se dejaron secar en incubadora a 37°C. Una vez secos, se disolvieron en 30 a 50 µl de cocktail de RNAsa (20 µg/ml).

La migración de los plásmidos se observó en geles de agarosa al 0.8%, para luego determinar la presencia del inserto mediante PCR.

47

# 8.5.8 Confirmación mediante PCR de la presencia de GABA ρ1 en el DNA plasmídico.

El DNA plasmídico de aquellas muestras que tuvieron una migración diferencial respecto del control negativo en la electroforesis, fueron utilizadas para realizar PCR y asegurar que contenían el fragmento esperado. Para ello, las muestras se diluyeron 1:50 y se incluyeron 3 µl del mismo en cada mezcla de reactivos. La mezcla de reactivos es la especificada en la **Tabla 6** solamente se ajustó la cantidad de agua, de tal forma que el volumen final fuera de 25 µl. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los productos, fueron los respectivos, de acuerdo a los utilizados en el primer paso de la estrategia para secuenciar **(Tabla 15).** Los ciclos para amplificar ambos fragmentos, 1 y 2, variaron incrementándose de 25 a 30 **(Tablas 16 y 17).** 

# 8.5.9. Secuenciación del DNA amplificado a partir de las clonas virales y del plásmido pGEM®-T Easy.

Las clonas que contenían el inserto y el plásmido pGEM®-T Easy, se enviaron a secuenciar en el Laboratorio de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se enviaron a secuenciar las clonas virales con los oligonucléotidos con los que se amplificaron los Fragmentos 1 y 2. El plásmido pGEM®-T Easy, utilizado en el proceso de recombinación, también se envió a secuenciar, en este caso con los oligonucleótidos M13 sentido y antisentido por ser secuencias contenidas en el mismo plásmido y se encuentran flanqueando a la secuencia de GABA p1.

#### 9 RESULTADOS

#### 9.1 Localización del sobrenadante adecuado para realizar las infecciones

#### 9.1.1 Propagación e infección de células Sf9.

Se propagó la línea celular Sf9 obteniéndose células sanas, redondas y de un tamaño homogéneo de aproximadamente 20 µm. Una vez que fueron infectadas, su morfología cambió, se observaron contornos irregulares e incremento en el diámetro celular (aproximadamente 10 µm más de su tamaño habitual), lo cual se puede evidenciar en la **Figura 13.** 



**Figura 13. Células Sf9**. En la fotografía A se muestran células sanas, en la B se observan células 72 h PI.

# 9.1.2 Confirmación mediante PCR de la secuencia de GABA ρ1 y regiones flanqueantes.

Se realizaron extracciones de DNA viral a partir de los sobrenadantes colectados, con la finalidad de determinar cuáles eran los que contenían partículas virales. Del tamizaje, sólo se logró obtener DNA viral de un sobrenadante; con el cual se realizaron las infecciones posteriores colectando las muestras desde las 24 h PI. En la **Figura 14 A** se puede observar un gel de agarosa con DNA de sobrenadantes colectados desde las 24 hasta las 72 h PI. Posteriormente, se realizó la PCR con el DNA de las 72 h PI con los oligonucleótidos del promotor de polihedrina y el epítopo V5,

obteniendo un producto de 1.6 kb. Con la misma muestra de DNA viral, en otra reacción, se realizó la PCR con oligonucleótidos de GABA p1 generando un producto de 1.4 kb. Ambos productos se muestran en la **Figura 14 B.** 



Figura 14. Obtención de DNA viral y productos de GABA  $\rho$ 1 y regiones flanqueantes. En la Figura 14 A se observa en el carril M el marcador de peso molecular Lambda *Pst* I; carril 1, DNA 24 h PI; carril 2 DNA, 48 h PI y carril 3, DNA 72 h PI. En la Figura 14 B se encuentra en el carril M el marcador Lambda *Pst* I; carril N control negativo; carril P el control positivo (pcDNA  $\rho$ 1); carril 1, producto amplificado con oligonucleótidos de polihedrina-V5 (1.6 kb); carril 2, producto amplificado con oligonucleótidos de GABA  $\rho$ 1 (1.4 kb).

#### 9.2 Experimentos con diferentes multiplicidades de infección (MOI) y horas PI

# 9.2.1 Obtención del título viral del sobrenadante utilizado en las infecciones.

Se contaron las placas generadas por las partículas virales **(Figura 15)** y se realizaron los cálculos pertinentes para obtener el título, el cual fue calculado en 2 x 10<sup>8</sup> pfu/ml. A su vez, se determinó la MOI (número de partículas virales por célula en pfu/cél) y la cantidad del inóculo requerido en experimentos de infección posteriores.



**Figura 15**. **Ensayo en placa**. **A** caja con control negativo, **B** caja con dilución viral  $10^{-3}$ , **C** caja con dilución viral  $10^{-4}$ , **D** con dilución viral  $10^{-5}$ , **E** con dilución viral  $10^{-6}$ .

En la **Figura 16** se muestran fotografías de las células visualizadas con microscopio invertido. Estas células fueron infectadas con las diluciones 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> en las que se visualizaron mejor las placas. Las células que captan el rojo neutro son células vivas que permiten el paso del colorante al interior de ella por un proceso de difusión para luego acumularse en el interior de los lisosomas.



**Figura 16. Células en ensayo en placa en microscopio invertido.** Se muestra una placa de cada dilución 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>, vistas con los objetivos 10X, 20X y 40X.

# 9.2.2 Confirmación de la presencia de GABA ρ1 en el DNA viral extraído con las diferentes MOI.

Se obtuvo DNA viral desde las 24 h hasta las 96 h Pl. En la **Figura 17** se muestra un ejemplo de extracciones de DNA a las 72 h Pl con tres multiplicidades de infección (2.8, 4 y 10 pfu/cél). Es preciso mencionar que en aquellos sobrenadantes de células sin infectar no había DNA viral.



**Figura 17**. **DNA viral de células Sf9 infectadas con baculovirus.** En el carril M se muestra el marcador GeneRuler Invitrogen ®; carriles 1-3 se muestran bandas de DNA viral 72 h postinfección con distintas MOI; carril 1, 10 pfu/cél; carril 2, 4 pfu/cél; carril 3, 2.8 pfu/cél.

Posteriormente se realizó la PCR de las muestras de DNA con tiempos postinfección (24, 48, 72 y 96 h) y MOI (2.8, 4 y 10 pfu/cél). En la **Figura 18** se muestra un ejemplo de la amplificación de GABA p1, a partir de DNA viral, obtenido a las 72 h PI con las diversas multiplicidades de infección.



Figura 18. Amplificación de productos de PCR con oligonucleótidos de GABA p1 a las 72 h Pl y con las diferentes MOI (1.4 kb). En el carril M se muestra el marcador Lambda *Pst* I; carril N control negativo; carril P el control positivo; carril 1, 10 pfu/cél; carril 2, 4 pfu/cél; carril 3, 2.8 pfu/cél.

Estos resultados permitieron concluir que el baculovirus aislado porta el DNA de GABA p1.

## 9.2.3 Confirmación de la transcripción de GABA p1.

Las extracciones de RNA fueron homogéneas entre las diferentes multiplicidades de infección, sólo varió respecto al tiempo de colecta (a mayor tiempo, mayor intensidad en las bandas). La muestra se tomó con base en un conteo de 1 x  $10^6$  células vivas **(Figura 19).** 



**Figura 19. RNA total de muestras con 72 h postinfección.** En el carril M se muestra el marcador Lambda *Pst* I; carril 1, 10 pfu/cél; carril 2, 4 pfu/cél; carril 3, 2.8 pfu/cél.

Se realizó la transcripción reversa a partir del RNA total como molde, posteriormente se llevó a cabo la PCR, en la cual, se utilizaron oligonucleótidos que permitieron la amplificación de GABA p1 (1.4Kb). Los transcritos se localizaron desde las 24 h hasta las 96 h PI y en todas las MOI. Como ejemplo de lo anterior, en la **Figura 20** se muestra un gel de agarosa al 0.8 % que contiene muestras 72 h PI con las diferentes MOI. Cabe mencionar que para el control negativo se utilizó cDNA de células sin infectar.



**Figura 20. Transcritos de GABA ρ1.** El carril M contiene el marcador Lambda *Pst* I; carril N control negativo (células sin infectar); carril P control positivo (pcDNA ρ1); carril 1, 10 pfu/cél; carril 2, 4 pfu/cél; carril 3, 2.8 pfu/cél.

#### 9.2.4 Registro de ovocitos inyectados con RNA o membranas.

Se realizó el registro de los ovocitos inyectados con RNA y membranas de células Sf9 infectadas en ambos casos con una n=2 sin obtenerse corrientes al estar en contacto con GABA. Con ello se podía inducir que la GABA p1 posiblemente no estuviera en la membrana plasmática, por lo que se recurrió a la inmunolocalización de la proteína.

9.2.5 Inmunolocalización de la proteína GABA ρ1 en las membranas de las células Sf9 infectadas.

#### 9.2.5.1 Expresión de GABA p1-GFP en células HEK 293.

Se transfectaron células HEK 293 con el plásmido pcDNA p1 GFP (Martínez-Torres y Miledi 2001), de esta forma, se contó con un control positivo para los ensayos de *Western blot*. Dado que GFP estaba contenida en el plásmido de transfección, fue posible hacer un cálculo aproximado de la eficiencia del procedimiento en 40%. Cabe hacer mención que los cultivos fueron observados 48 h post-transfección como se muestran en la **Figura 21**.



Figura 21. Células HEK transfectadas. Los cuatro campos muestran células observadas en el microscopio de epifluorescencia con un objetivo 40X. A son células visualizadas en campo claro y B son células que corresponden al mismo campo de células bajo la incidencia de luz ultravioleta; las cuales fungen como control negativo. C y D es el mismo campo de células transfectadas; en C se observan en campo claro y en D bajo luz ultravioleta y en campo oscuro. Escala 50  $\mu$ .

# 9.2.5.2 Visualización de las proteínas de membrana en gel desnaturalizante e inmunolocalización de GABA ρ1 mediante *Western blot*.

Una vez asegurada la presencia del DNA de GABA p1 en la partícula viral y además de haber identificado los transcritos de GABA p1 en las células infectadas, se

procedió a aislar las membranas plasmáticas por ultracentrifugación. Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % con una MOI de 4 pfu/cél en las diferentes horas postinfección; sin observarse alguna banda de forma predominante. A cada carril le correspondió un volumen de 15  $\mu$ l de membranas en un volumen total de 100  $\mu$ l que provenían de suspensiones de 10<sup>7</sup> y 10<sup>6</sup> células Sf9 y HEK 293, respectivamente (**Figura 22 A**).

Por otra parte, para la inmunolocalización de GABA p1 mediante *Western blot* en membranas de células Sf9 infectadas se utilizaron tres anticuerpos primarios en ensayos independientes:

**Anticuerpo primario anti-p1 C-20.** Estos experimentos con una n=4 evidenciaron la expresión del control positivo entre los pesos de 64 y 82 kDa. Las demás bandas en la membrana de nitrocelulosa se consideran inespecíficas; mientras que en los carriles correspondientes a las membranas de células Sf9, no se pudo ubicar ninguna banda correspondiente a GABA p1.

**Anticuerpo primario anti-Histidinas**. En dicho *Western blot* se obtuvieron señales inespecíficas en gran parte de la membrana, lo cual impidió tener certeza para localizar la banda correspondiente a GABA p1. Este experimento contó con una n=5.

Anticuerpo primario anti- $\rho$ 1 N-19. Estos ensayos cuentan con una n=2 y se muestra un ejemplo de ellos en la Figura 22 B. En ella se puede observar la expresión del control positivo en el carril 8, el cual presentó la banda correspondiente a la proteína GABA  $\rho$ 1 (47 kDa) en unión con GFP (30 kDa), la cual se encuentra por arriba de la banda de 64 kDa. Las demás bandas son consideradas como inespecíficas.

Con ninguno de los ensayos de *Western blot* fue posible inmunolocalizar a la proteína GABA p1, ni siquiera en el extracto completo de células Sf9 infectadas.


Figura 22. Gel de poliacrilamida al 12% (Figura 22 A) y Western blot con anticuerpo primario dirigido contra GABA-p1 N-19 (Figura 22 B). En ambas figuras el carril M es el marcador BenchMarker<sup>™</sup> Prestained Invitrogen ®. Carriles 1 al 6 corresponden a muestras de células Sf9, mientras que los carriles 7 y 8 contienen muestras de células HEK 293. Carril 1, membranas 96 h PI; carril 2, membranas 72 h PI; carril 3, membranas 48 h PI; carril 4, membranas 24 h PI; carril 5, membranas de células Sf9 sin infectar; carril 6, extracto completo de Sf9 infectadas; carril 7, membranas de células HEK 293 sin transfectar; carril 8, membranas de células HEK 293 transfectadas.

#### 9.3 Verificación de la secuencia del DNA viral.

# 9.3.1 Determinación de la presencia de GABA ρ1 en las clonas seleccionadas.

Dado que no se localizaba a GABA p1 mediante *Western blot* y tampoco se tenían corrientes en el registro electrofisiológico, se envió a secuenciar una muestra de DNA viral con una población heterogénea de partículas virales; sin obtener una secuencia legible. Por tal razón se realizó el ensayo en placa y se seleccionaron clonas independientes. En este ensayo se eligieron 34 clonas; con las que se infectaron cultivos celulares durante 24 a 120 h PI y los sobrenadantes fueron utilizados para extraer de DNA viral. En la **Figura 24**, se muestran 9 de las 24 muestras de las que se extrajo DNA viral; es decir, 10 de las 34 clonas seleccionadas no contenían partículas virales.



**Figura 24**. **DNA viral de células Sf9 infectadas con baculovirus.** En el carril M se muestra el marcador GeneRuler Invitrogen ®; carriles 1-9 se muestran bandas de DNA viral 24 a 120 h PI postinfección.

Se realizó la PCR con oligonucleótidos para amplificar GABA p1 en las 24 muestras que presentaron DNA viral, de las cuales, sólo 10 amplificaron los productos correspondientes a GABA p1 completo. En la **Figura 25** se presentan dos geles de agarosa al 1% en los que se observan 5 de los 10 productos de PCR que amplificaron GABA p1 (1.4 kb). La figura señalada hace evidente que no todas las clonas virales contienen el inserto de GABA p1.



**Figura 25. Determinación de la presencia de GABA p1 mediante PCR**. Los carriles M muestran el marcador GeneRuler Invitrogen ®; el carril N el control negativo, el carril P el control positivo; carriles 5, 6, 8, 10, 11 son muestras que provienen de clonas virales que contienen la secuencia de GABA p1; mientras que los carriles 1-4, 7, 9, 12 fueron clonas que no continuaron en el proceso de selección debido a que no contenían el inserto.

#### 9.3.2 Determinación de la presencia de los Fragmentos 1 y 2.

El Fragmento 1 se encuentra ubicado río arriba del inserto de GABA p1 y se encuentra esquematizado en la **Figura 11**, ubicada en la sección de Materiales y Métodos. En la **Figura 26** se observan 9 de 11 productos amplificados correspondientes al Fragmento P1.



**Figura 26. Fragmento 1.** En el carril M se muestra el marcador GeneRuler Invitrogen ®; en el carril N el control negativo, en el carril P el control positivo y en el carril 1-8 y 10 se ubican los productos de 519 pb que abarcan una región de inicio de la transcripción viral, parte del promotor de polihedrina, un sitio de recombinación y un segmento de la región 5' de GABA p1.

El Fragmento 2 se encuentra ubicado río abajo del inserto de GABA p1 y está esquematizado en la **Figura 12** ubicada en la sección de Materiales y métodos. En la **Figura 27** se observan 10 de 11 productos amplificados correspondientes al Fragmento 2.



**Figura 27**. **Fragmento 2.** En el carril M se muestra el marcador GeneRuler Invitrogen ®; en el carril N el control negativo, carril P el control positivo y en los carriles 1-8, 10 y 11 se ubica el producto de 383 pb hacia la región 3' de GABA p1, el cual abarca: un sitio de recombinación, el epitopo V5, la etiqueta de seis histidinas, el codón de paro y parte de la secuencia nucleotídica del baculovirus.

#### 9.3.3 Verificación de la ligación de GABA ρ1 en pGEM®-T Easy

Los productos correspondientes a los Fragmentos 1 y 2, amplificados mediante PCR, fueron purificados a partir de geles de agarosa al 0.8%. El DNA fue ligado en el vector pGEM®-T Easy para después transformar bacterias XL1-Blue y resembrar las colonias seleccionadas (colonias blancas). Posteriormente se purificó el DNA plasmídico en preparación de pequeña escala y se realizó electroforesis en geles de

agarosa al 0.8% para reconocer las clonas que contenían el inserto, como se observa en la **Figura 28.** Con este ensayo se determinó una migración diferencial entre el control negativo (pGEM®-T Easy sin ligar), y las clonas que contenían el inserto, ya que estas últimas migraron una menor distancia debido al incremento en su peso molecular.



**Figura 28. pGEM®-T Easy ligado con el Fragmento 1.** En el carril N se muestra el DNA plasmídico de pGEMT-Easy sin fragmento ligado; carril P muestra el control positivo del kit y en los carriles 1 al 7 se encuentran las muestras de DNA plasmídico que se ligaron con los productos de PCR, en este caso con los del fragmento 1.

Las clonas que presentaron una migración diferencial respecto del control negativo, se sometieron a PCR para asegurar que se debía al inserto de interés. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los productos, fueron los correspondientes para amplificar el Fragmento 1 (gel de la izquierda) y del Fragmento 2 (gel de la derecha) mostrados en la **Figura 29**.



**Figura 29. Fragmento 1 y 2 amplificados a partir de las clonas.** En los carriles M se observa el marcador de peso molecular Gene Ruler Invitrogen ®, carriles N control negativo, carriles P control positivo y carriles del 1 al 7 contienen los productos de 519 y 383 pb respectivamente.

#### 9.3.4 Secuenciación de DNA y del plásmido pGEM®-T Easy.

Las muestras que se enviaron a secuenciar fueron en total 11 productos de PCR provenientes del DNA de las clonas virales seleccionadas. En todas las secuencias se localizó una deleción de una adenina en el segundo codón de la secuencia traducible de GABA p1 (**Figura 30**). Se revisaron los electroforetogramas correspondientes, los cuales, mostraron la misma deleción y la ausencia del pico que debiese corresponder al deoxinucleótido de adenosina ubicado en el segundo codón de GABA p1 (**Figura 30**). Ya que los hallazgos de la deleción eran reiterados en las clonas virales, se optó por secuenciar el plásmido que se utilizó para la recombinación, pENTR/D-TOPO p1. El resultado fue el mismo, la ausencia del deoxinucleótido de adenosina en el segundo codón.



Figura 30. Secuencia y electroforetograma de pGEM®-T Easy. Secuencia teórica de GABA p1 comparada con la secuencia obtenida, en la que se muestra la deleción del deoxinucleótido de adenosina marcado con un asterisco. En el electroforetograma se indica con flechas, el lugar que debió ocupar el deoxinucleótido.

#### **10 DISCUSIÓN**

Las células Sf9 propagaron eficientemente el baculovirus que porta el DNA de GABA  $\rho$ 1; además, fue posible identificar los transcritos correspondientes. Sin embargo, la proteína no fue detectada en ensayos de *Western blot,* ni se obtuvieron corrientes generadas por GABA después de inyectar el mRNA o membranas de células Sf9 infectadas con el Baculovirus/GABA  $\rho$ 1 en ovocitos de *X. laevis* debido a que, según los resultados de la secuenciación, se comprobó que tanto el virus como el plásmido con el que se originó la construcción Baculovirus/GABA  $\rho$ 1, portan una mutación en el segundo codón de la secuencia de GABA  $\rho$ 1. La naturaleza de la mutación consiste en la deleción del deoxinucleótido de adenosina, la cual desfasa la lectura del gen, presentando como consecuencia resultados negativos al tratar de inmunolocalizarla y de expresarla en el sistema heterólogo en ovocitos de *X. laevis*.

La deleción puntual es la causa directa de que el receptor GABA p1 no fuese generada, a pesar de la eficiencia de propagación del virus y de un adecuado proceso de transcripción. Sin embargo, estos resultados permiten mantener en pie la perspectiva de utilizar el sistema Baculovirus/células Sf9 para expresar a GABA p1 de manera funcional.

#### **11 CONCLUSIONES**

- 1) El baculovirus que porta el DNA de GABA p1 se propagó eficientemente.
- 2) La transcripción de GABA p1 se llevó a cabo en células Sf9 infectadas.
- Una mutación puntual en el segundo codón de GABA ρ1 desfasa el marco de lectura del gen.
- Los resultados presentados, no permiten concluir si el sistema es apto o no para la producción de GABA ρ1.

#### **12 PERSPECTIVAS**

Con base en las conclusiones expuestas previamente, se plantea que los procedimientos expuestos en el presente trabajo, podrán ser reproducidos con la utilización de una clona que contenga la secuencia de GABA p1, de tal forma que permita la expresión en fase de lectura de la proteína.

62

#### **13 REFERENCIAS**

- Abdel-Halim H, Hanrahan JR, Hibbs DE, Johnston GAR., Chebib A. 2008. A molecular basis for agonist and antagonist actions at GABA<sub>C</sub> receptors. Chem Biol Drug Des 71, 306–327.
- 2 Alakuijala A. 2007. Expression of functional GABAc receptors in the brain. Helsinki: University of Helsinki. ISBN 978-952-10-4195-2.
- 3 Alakuijala A, Alakuijala J, Pasternack M. 2006. Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. Eur J Neurosci 23, 514-520.
- 4 Alakuijala A, Talvioja K, Pasternack A, Pasternack M. 2005. Functional characterization of rat ρ2 subunits expressed in HEK 293. Eur J Neurosci 21, 692-700.
- 5 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. España:Omega. 2004.
- 6 Albrecht BE, Breitenbach U, Stühmer T, Harvey RJ, Darlison MG. 1997. In situ hybridization and reverse transcription–polymerase chain reaction studies on the expression of the GABA<sub>C</sub> receptor ρ1- and ρ2-subunit genes in avian and rat brain. Eur J Neurosci 9, 2414–2422.
- 7 Atkinson AE, Bermudez I, Darlison MG, Barnard EA, Earley FGP, Possee RD, Beadle DJ, King LA. 1992. Assembly of functional GABA<sub>A</sub> receptors in insect cells using baculovirus expression vectors. NeuroReport 3, 597-600.
- 8 Balbás P, Lorence A. 2004. Recombinant gene expression. Reviews and protocols. EUA: Humana Press.
- 9 Belelli D, Pau D, Cabras G, Peters JA, Lambert JJ. 1999. A single amino acid confers barbiturate sensitivity upon the GABA ρ1 receptor. Br J Pharmacol 127, 601-604.
- 10 Bettler B y Tiao JY. 2006. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABA<sub>B</sub> receptors. Pharmacol Ther 110, 533-543.
- 11 Blein S, Hawrot E, Barlow P. 2000. The metabotropic GABA receptor: molecular insights and their functional consequences. Cell Mol Life Sci 57, 635-650.
- 12 Birnir B, Tierney M, Howitt S, Cox G, Gage P. 1992. A combination of human α1 y β1 subunitsis required for formation of detectable GABA-activated chloride

channels in Sf9 cells. Proc Biol Sci 250, 307-312.

- 13 Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons. J Physiol 385, 243-286.
- 14 Bormann J. 1988. Electrophysiology of  $GABA_A$  and  $GABA_B$  receptor subtypes. Trends Neurosci 11, 112-116.
- 15 Bormann J. 2000. The ABC of GABA receptors. Trends Pharmacol Sci 21, 16-19.
- 16 Boué-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Garret M. 1998. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. J Neurochem 70, 899– 907.
- 17 Boué-Grabot E, Taupignon A, Tramu G, Garret M. 2000. Molecular and electrophysiological evidence for a GABAc receptor in thyrotropin-secreting cells. Endocrinology 141, 1627–1632.
- 18 Bowery N, Enna S. 1997. The GABA receptors. 2a. ed. EUA :Humana.
- 19 Bowery N. 1989. GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian. Trends Pharmacol Sci 10, 401-407.
- 20 Calero CI, Calvo DJ. 2008. Redox modulation of homomeric  $\rho$ 1 GABA<sub>C</sub> receptors. J Neurochem 105, 2367-2374.
- 21 Calvo DJ, Vázquez AE, Miledi R. 1994. Cationic modulation of ρ1-type γaminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes (chloride channels/retina receptors/Zn2+ inhibition/La3+ potentiation). Proc Natl Acad Sci USA 91, 12725-12729.
- 22 Chang Y, Amin J, Weiss DS. 1995. Zinc is a mixed antagonist of homomeric p1 yaminobutyric acid-activated channels. Mol Pharmacol 47, 595-602.
- 23 Chen Y, Zhou D, Zhou K, Ren Y, Dai W, Xu M, Lu L, Lu Z. 2007. Study on olfactory function in GABA(C) receptor/channel rho(1) subunit knockout mice. Neurosci Lett 427, 10–15.
- 24 Chen X, Ealey K, Luo W, Lin SH, Schilling WP. 1996. Functional expression of a human thrombin receptor in Sf9 insect cells: evidence for an active tethered ligand. Biochem J 314, 603-611.
- 25 Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka

TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. 2007. High resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$  adrenergic G protein–coupled receptor. Science 318, 1258-1265.

- 26 Chomczynski P y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162, 156-159.
- 27 Cote TE, Gosse ME, Weems HB. 1993. Solubilization of high-affinity, guanine nucleotide-sensitive μ-opioid receptors from 7315c cell membranes. J Neurochem 61, 973-978.
- 28 Cutting GR, Curristin S, Zoghbi H, O'Hara B, Seldin MF, Uhl GR. 1992. Identification of a putative γ-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho, cDNA and colocalization of the genes encoding rho, (GABRp2) and rho, (GABRp1) to human chromosome 6ql4-q21 and mouse chromosome 4. Genomics 12, 801-806.
- 29 Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM. 1991. Cloning of the γ-aminobutyric acid (GABA) ρ1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. Proc Natl Acad Sci USA 88, 2673-2677.
- 30 Dalziel J, Cox G, Gage P, Birnir B. 2000. Mutating the highly conserved second membrane-spanning region 9' leucine residue in the α1 o β1 subunit produces subunit-specific changes in the function of human α1β1 γ-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors. Mol Pharm 57, 875-882.
- 31 Daram P, Urbach S, Gaymard F, Sentenac H, Cherel I. 1997. Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain EMBO J 16, 3455–3463.
- 32 Davies PA, Hanna MC, Hales TG, Kirkness EF. 1997. Insensitivity of anesthetic agents conferred by a class of GABA<sub>A</sub> receptor subunit. Nature 385, 820-823.
- 33 Doble A, Martin IL. 1992. Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. Trends Pharmacol Sci 13, 76-81.
- 34 Dolby V, Collén A, Lundqvist A, Cronet P. 2004. Overexpression and functional characterisation of the human melanocortin 4 receptor in Sf9 cells. Protein Expr Purif 37, 455–461.

- 35 Eifler N, Duckely M, Sumanovski L, Egan T, Oksche A, Konopka JB, Lüthi A, Engel A Werten PJL. 2007. Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. J Struct Biol 159, 179-193.
- 36 Engblom A, Carlson B, Olsen R, Schousboe A, Kristiansen U. 2002. Point mutation in the first transmembrane region of the β2 subunit of the γ aminobutyric acid type A receptor alters desensitization kinetics of γ aminobutyric acid- and anesthetic-induced channel gating. J Biol Chem 277, 17438-17447.
- 37 Enz R, Brandstätter JH, Hartveit E, Wässle H, Bormann J. 1995. Expression of GABA receptor p<sub>1</sub> and p<sub>2</sub> subunits in the retina and brain of the rat. Eur J Neurosci 7, 1495–1501.
- 38 Enz R, Cutting GR. 1999. GABA<sub>C</sub> receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. Eur J Neurosci 11, 41–50.
- 39 Fletcher EL, Clark MJ, Senior P, Furness JB. 2001. Gene expression and localization of GABAc receptors in neurons of the rat gastrointestinal tract. Neuroscience 107, 181–189.
- 40 Frazao R, Noguiera MI, Wässle H. 2007. Colocalization of synaptic GABA<sub>C</sub> receptors with GABA<sub>A</sub>-receptors and glycine-receptors in the rodent central nervous system. Cell Tissue Res 330, 1–15.
- 41 Garret M, Bascles L, Boue-Grabot E, Sartor P, Charron G, Bloch B, Margolskee RF. 1997. An mRNA encoding a putative GABA-gated chloride channel is expressed in the human cardiac conduction system. J Neurochem 68, 1382-1389.
- 42 Gibbs ME, Johnston GA. 2005. Opposing roles for GABA-A and GABA-C receptors short-term memory formation in young chicks. Neuroscience 131, 567-576.
- 43 Gómez-Ramos A, Abad X, López FM, Bhat R. 2004. Expression of an altered form of tau in Sf9 insect cells results in the assembly of polymers resembling Alzheimer's paired helical filaments. Brain Res 1007, 57–64.
- 44 Goutman JD, Waxemberga MD, Doñate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ. 2003. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub>

receptors. Eur J Pharmacol 461, 79-87.

- 45 Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GAR. 2006. Mixed antagonistic effects of bilobalide at ρ1 GABA<sub>C</sub> receptor. Neuroscience 137, 607– 617.
- 46 Huang Z. 2006. GABA<sub>B</sub> Receptor isoforms caught in action at the scene. Neuron 50, 521-524.
- 47 Jansen A, Hoepfner M, Herzig H, Riecken O, Scherübl H. 2000. GABAC receptors in neuroendocrine gut cells: a new GABA-binding site in the gut. Eur J Physiol 441, 294–300.
- 48 Jasti J, Furukawa H, Gonzalez EB, Gouaux E. 2007. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. Nature 449, 316-323.
- 49 Johnston GA. 1996. GABAc receptors: relatively simple transmitter gated ion channels?. Trends Pharmacol Sci 17, 319-323.
- 50 Jost B, Grabert J, Patz S, Schmidt M, Wahle P. 2006. GABAc receptor subunit mRNA expression in the rat superior colliculus is regulated by calcium channels, neurotrophins, and GABAc receptor activity. Brain Cell Biol 35, 251–266.
- 51 Joyce KA, Atkinson AE, Bermudez I, Beadle DJ, King LA. 1993. Synthesis of functional GABA<sub>A</sub> receptors in stable insect cell lines. FEBS Lett 335, 61-64.
- 52 Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principles of neural science. 4a. ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- 53 Kaupmann K, Huggel K, Heid J, et al. Expression cloning of GABA<sub>B</sub> receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. Nature 1997;386:239-246.
- 54 King LA, Mann SG, Marlow SA, Bennudez I, Lawrie AM, Obosi LA, Atkinson AE. 1992. Baculovirus and recombinant protein production processes. USA: Roche.
- 55 Krehan D, Frølund B, Krogsgaard-Larsen P, Kehler J, Johnston GAR, Chebib M. 2003. Phosphinic, phosphonic and seleninic acid bioisosteres of isonipecotic acid as novel and selective GABAC receptor antagonists. Neurochem Int 42, 561– 565.
- 56 Li S, Zhang Y, Yan Y, Li Y. 2008. Identification and expression of GABAc receptor in rat testis and spermatozoa. Acta Biochim Biophys Sin 40, 761-767.

- 57 Lindquist CE, Laver DR, Birnir B. 2005. The mechanism of SR95531 inhibition at GABA<sub>A</sub> receptors examined in human  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 y  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 2s receptors. J Neurochem 94, 491-501.
- 58 López-Chávez A, Miledi R, Martínez-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 53, 421-427.
- 59 López Salas FE. 2007. Expresión del receptor GABAc ρ1 en un sistema libre de células. (Tesis de maestría). México: Instituto de Neurobiología UNAM.
- 60 Lukasiewicz PD, Eggers ED, Sagdullaev BT, McCall MA. 2004. GABA<sub>C</sub> receptormediated inhibition in the retina. Vision Res 44, 3289–3296.
- 61 Lukasiewicz PD y Shields CR. 1998. Different combinations of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses. J Neurophysiol 79, 3157-3167.
- 62 Martínez-Martínez A, Reyes-Ruíz JM, Martínez-Torres A, Miledi R. 2004 Functional expression in frog oocytes of human ρ1 receptors produced in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 101, 682–686.
- 63 Martínez-Torres A, Miledi R. 2001. Expression of γ-aminobutyric acid p1 and p1D450 as gene fusions with the green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA 98, 1947–1951.
- 64 Martínez-Torres A y Miledi R. 2004. Expression of functional receptors by the human  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub>  $\gamma$ 2 subunit. Proc Natl Acad Sci. USA 101, 3220–3223.
- 65 Masland RH. 2001. The fundamental plan of the retina. Nature neurosci 4, 877-886.
- 66 McCall MA, Lukasiewicz PD, Gregg RG. 2002. Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA(C) receptor expression and alters visual processing in the mouse retina. J Neurosci 22, 4163–4174.
- 67 Mcdonald RL, Olsen RW. 1994. GABA<sub>A</sub> receptor channels. Ann Rev Neurosci 17, 569-602.
- 68 McKernan RM, Whiting PJ. 1996. Which GABA<sub>A</sub> receptor subtypes really occur in the brain? Trends Neurosci 19, 139–143.

- 69 Miko A, Werby E, Sun Hui, Healey J, Zhang L. 2004. A TM2 Residue in the β1 subunit determines spontaneous opening of homomeric and heteromeric γ-aminobutyric acid-gated ion channels. J Biol Chem 279, 22833–22840.
- 70 Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, Deuchars SA. 2004. Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptor subunits in native central neurons. J Neurosci 24, 7241–7250.
- 71 Morris KDW, Moorefield CN, Amin J. 1999. Differential modulation of the γaminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids. Mol Pharmacol 56, 752–759.
- 72 Murhammer DW. 2007. Baculovirus and insect cell expression protocols. 2a. ed. EUA: Humana Press.
- 73 Murphy CI, Piwnica-Worms H. 2000. Overview of the baculovirus expresión system. Curr Protoc Protein Sci 4.18.1-4.18.4.
- 74 Okano K, Vanarsdall AL, Mikhailov VS, Rohrmann GF. 2006. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. Virology 344, 77–87.
- 75 Olsen RW y Sieghart W. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Pharmacol Rev 60, 243-260.
- 76 Olsen RW y Sieghart W. 2009. GABA<sub>A</sub> receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. Neuropharmacology 56, 141–148.
- 77 Olsen RW, Tobin AJ. 1990. Molecular biology of GABA<sup>A</sup> receptors. FASEB J 4, 1469-1480.
- 78 Palma E, Trettel F, Fucile S, Renzi M, Miledi R, Eusebi F. 2003. Microtransplantation of membranes from cultured cells to *Xenopus* oocytes: a method to study neurotransmitter receptors embedded in native lipids. Proc Natl Acad Sci USA 100, 2896-2900.
- 79 Pan Y, Ripps H, Qian H. 2006. Random assembly of GABA ρ1 and ρ2 subunits in the formation of heteromeric GABA<sub>C</sub> receptors. Cell Mol Neurobiol 26, 289-305.
- 80 Park SH y Wells JW. 2003. Monomers and oligomers of the M2 muscarinic cholinergic receptor purified from Sf9 cells. Biochemistry 42, 12960-12971.
- 81 Piljam GP, de Vrij J, van den EFJ, Vlak JM, Martens DE. 2004. Evaluation of

baculovirus expression vectors with enhanced stability in continuous cascaded insect-cell bioreactors. Biotechnol Bioeng 87, 743-753.

- 82 Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. 1991. Expression of mammalian γaminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. Proc Natl Acad Sci USA 88, 4318-4322.
- 83 Qian H, Dowling JE. 1993. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. Nature 361, 159-162.
- 84 Qian H, Pan Y, Zhu Y, Khalili P. 2005. Picrotoxin accelerates relaxation of GABA<sub>C</sub> receptors. Mol Pharmacol 67, 470–479.
- 85 Ragozzino D, Woodward RM, Murata Y, Eusebi F, Overman LE, Miledi R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gammaaminobutyric acid C receptor antagonist. Mol Pharmacol 50, 1024–1030.
- 86 Ratra GS, Kamita SG, Casida JE. 2001. Role of human GABA<sub>A</sub> receptor β3 subunit in insecticide toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 172, 233–240.
- 87 Rosas-Arellano A, Ochoa-de la Paz LD, Miledi R, Martínez-Torres A. 2007. Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA ρ1 receptor. Neurosci Res 57, 347-353.
- 88 Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E. 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABA<sub>C</sub> receptor ρ1 and ρ2 subunits in developing rat brain and spinal cord. Eur J Neurosci 15, 1747–1758.
- 89 Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. 3a. ed. EUA: Press.
- 90 Schlicker K, McCall MA, Schmidt M. 2009. GABAc Receptor-mediated Inhibition Is altered but not eliminated in the superior colliculus of GABAc ρ1 knockout mice. J Neurophysiol 101, 2974–2983.
- 91 Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. 2004. Analysis of the set of GABA<sub>A</sub> receptor genes in the human genome. J Biol Chem 279, 41422–41435.
- 92 Silvilotti L, Nistri A. 1991. GABA receptor mechanism in the central nervous system. Prog Neurobiol 36, 35-92.
- 93 Smith M, Lindquist C, Birnir B. 2003. Evidence for inhibitory effect of the agonist gaboxadol at human α1β2γ2S GABAA receptors. Eur J Pharm 478, 21-26.

- 94 Soghomonian JJ, Martin DL. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? Trends Pharmacol Sci 19, 500–505.
- 95 Strata F, Cherubini E. 1994. Transient expresión of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurons during development. J Physiol 480, 493-503.
- 96 Taylor MRG. 2007. Pharmacogenetics of the human beta-adrenergic receptors. Pharmacogenomics J. 7, 29–37.
- 97 Trogadis JE, O'Dowd BE, George SR, Stevens JK. 1995. Dopamine D1 receptor distribution in Sf9 cells imaged by confocal microscopy: a quantitative evaluation. J Histochem Cytochem 43, 497-506.
- 98 Wang JB, Johnson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR. 1994. Human  $\mu$  opiate receptor: cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. FEBS Lett 338, 217-222.
- 99 Wang Tian-L, Guggino WB, Cutting G. 1994. A novel γ-aminobutyric acid receptor subunit (p2) cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. J Neurosci 14, 6524-6531.
- 100 Warne T, Chirnside J, Schertler GFX. 2003. Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey beta-adrenergic receptors for crystallization. Biochim Byophys Acta 1610, 133-140.
- 101 Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R. 2008. Structure of a β<sub>1</sub>-adrenergic G-protein coupled receptor. Nature 454, 486-491.
- 102 Wegelius K. 2000. Distribution and function of GABA receptor ρ subunits in the rat nervous system. Helsinki: University of Helsinki. ISBN 951-45-9425-8.
- 103 Wegelius K, Pasternack M, Hiltunen JO, Rivera C, Kaila K, Saarma M, Reeben M. 1998. Distribution of GABA receptor ρ subunit transcripts in the rat brain. Eur J Neurosci 10, 350-357.
- 104 Wegelius K, Reeben M, Rivera C, Kaila K, Saarma M, Pasternack M. 1996. The rho 1 GABA receptor cloned from rat retina is down modulated by protons. Neuroreport 7, 2005-2009.
- 105 Werten P, Hasler L, Koenderink J, Klaassen C, Grip W, Engel A, Deen P. 2001.

Large scale purification of functional recombinant human aquaporin-2. FEBS Lett 504, 200-205.

- 106 Westh-Hansen SE, Rasmussen PB, Hastrup S, Nabekura J, Noguchi K, Akaike N, Witt MR, Nielsen M. 1997. Decreased agonist sensitivity of human GABA A receptors by an amino acid variant, isoleucine to valine, in the subunit. Eur J Pharmacol 329, 253-257.
- 107 Wie Q, Zhou DH, Shen KX, Chen J, Chen Lw, Wang TL, Pei G, Chi ZQ. 2000. Human μ-opioid receptor overexpressed in Sf9 insect cells functionally coupled to endogenous Gi/o proteins. Cell Res 10, 93—102.
- 108 Woodward R, Polenzani L, Miledi R. 1992. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive γ-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes I. Effects of Cl<sup>-</sup> channel Inhibitors. Mol Pharm 42, 165-173.
- 109 Woodward R, Polenzani L, Miledi R. 1993. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (ρ-like) γ-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes II. Pharmacology of γ-aminobutyric acid<sub>A</sub> and γ-aminobutyric acid<sub>B</sub> receptor agonists and antagonists. Mol Pharm 43, 609-625.
- 110 Yamashita M, Ikemoto Y, Nielsen M, Yano T. 1999. Effects of isoflurane and hexafluorodiethyl ether on human recombinant GABA receptors expressed in Sf 9 cells. Eur J Pharmacol 378, 223–231.
- 111 Yang XL. 2004. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. Prog Neurobiol 73, 127–150.
- 112 Zhang D, Pan Z, Awobuluyi M, Lipton SA. 2001. Structure and function of GABA<sub>C</sub> Receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. Trends Pharmacol Sci 22, 121-132.
- 113 Zhang D, Pan Z, Zhang X, Brideau AD, Lipton SA. 1995. Cloning of a yaminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. Proc Natl Acad Sci USA 92, 11756-11760.
- 114 Zheng W, Xie W, Zhang J, Strong JA, Wang L, Yu L, Xu M, Lu L. 2003. Function of gammaaminobutyric acid receptor/channel rho 1 subunits in spinal cord. J Biol Chem 278, 48321-48329.

#### **14 LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Receptor metabotrópico GABA<sub>B</sub>.
- Figura 2. Receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub>.
- Figura 3. Receptor ionotrópico GABA p1.
- Figura 4. Diagrama de la retina.
- Figura 5. Diagrama del genoma del AcMNPV.

**Figura 6.** Infecciones primaria y secundaria generadas por baculovirus en un ambiente natural.

Figura 7. Células Sf9 sin infectar.

Figura 8. Mapa funcional del baculovirus.

Figura 9. Fragmento amplificado de GABA p1 y regiones flanqueantes.

- Figura 10. Título viral y MOI.
- Figura 11. Amplificación de una región río arriba del inserto de GABA p1.
- Figura 12. Amplificación de una región río abajo del inserto de GABA p1.
- Figura 13. Células Sf9.
- Figura 14. Obtención de DNA viral y productos de GABA p1. y regiones flanqueantes.
- Figura 15. Ensayo en placa.
- Figura 16. Células en ensayo en placa en microscopio invertido.
- Figura 17. DNA viral de células Sf9 infectadas con baculovirus.
- Figura 18. Amplificación de productos de PCR con oligonucleótidos de GABA p1 a las
- 72 h PI y con las diferentes MOI (1.4 kb).
- Figura 19. RNA total de muestras con 72 h postinfección.
- Figura 20. Transcritos de GABA p1.
- Figura 21. Células HEK transfectadas.

**Figura 22.** Gel de poliacrilamida al 12%. Muestras de membranas de células HEK 293 transfectadas con pcDNA ρ1-GFP y células Sf9 infectadas con una MOI de 4 pfu/cél.

- Figura 23. Western blot con anticuerpo primario dirigido contra GABA-p1 N-19.
- Figura 24. DNA viral de células Sf9 infectadas con baculovirus.
- Figura 25. Determinación de la presencia de GABA p1 mediante PCR.
- Figura 26. Fragmento 1.

Figura 27. Fragmento 2.

- Figura 28. pGEMT-Easy ligado con el Fragmento 1.
- **Figura 29.** Fragmento 1 y 2 amplificados a partir de las clonas.
- Figura 30. Secuencia y electroforetograma de pGEM®-T Easy.

#### **15 LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1** Propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores ionotrópicos aGABA.

Tabla 2. Consideraciones y usos del medio de cultivo.

 Tabla 3. Antimicótico y antibióticos utilizados en el medio de cultivo.

**Tabla 4**. Oligonucleótidos de GABA ρ 1, polihedrina y V5.

**Tabla 5**. Condiciones de amplificación de productos de GABA p1 y desde el promotor de polihedrina hasta el epítopo V5.

Tabla 6. Reactivos utilizados en cada ensayo de PCR.

Tabla 7. Mezcla I para transcripción reversa.

Tabla 8. Mezcla II para transcripción reversa.

**Tabla 9.** Programa de ciclos para realizar la transcripción reversa.

Tabla 10. Mezcla I para transfectar células HEK 293.

 Tabla 11. Mezcla II para transfectar células HEK 293.

**Tabla 12**. Reactivos utilizados en la preparación de geles desnaturalizantes.

Tabla 13. Anticuerpos primarios.

 Tabla 14. Anticuerpos secundarios.

**Tabla 15.** Oligonucleótidos para amplificar dos regiones: río arriba y río abajo de GABA p1.

Tabla 16. Condiciones de amplificación de productos de GABA p1 en la región 5'.

Tabla 17. Condiciones de amplificación de productos de GABA p1 en la región 3'.

**Tabla 18**. Reactivos utilizados en las reacciones de ligación.

# 16 APÉNDICE DE SOLUCIONES DE TRABAJO

# 1 Extracción de RNA

#### Solución D

4M Tiocianato de guanidinio 25mM Citrato de sodio 0.5% Lauril sarcosil sodio 0.1 M β- Mercaptoetanol

#### 2 Transformación de bacterias

## LB sólido

10 g Triptona 5 g Extracto de levadura 10 g Cloruro de sodio (NaCl)

15 g Bacto agar

Disolver en 1L de agua y esterilizar en autoclave.

## Preparación de placas con LB y ampicilina

Una vez esterilizado el medio, dejar enfriar un poco y agregar 1 ml de ampicilina 50 mg/ml.

Llenar las cajas en ambiente estéril y dejar polimerizar.

Almacenar en refrigeración.

## LB Líquido

10 g Triptona
5 g Extracto de levadura
10 g NaCl
Disolver en 1L de agua y esterilizar en autoclave.

#### 3 Preparaciones de DNA a escala pequeña

#### Solución de RNAsa

10 μl de RNAsa (20 mg/ml) 990 μl agua bidestilada.

## Solución alcalina I

50 mM Glucosa 25 mM Tris – ácido clorhídrico (Tris-HCI) pH 8 10 mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.

## Solución alcalina II

0.2 N Hidróxido de sodio (NaOH) de stock 10 N1% (peso/volumen) Dodecil sulfato de sodio (SDS).

## Solución alcalina III

60 ml de Acetato de Potasio 5 M 11.5 ml Ácido acético glacial 28.5 Agua bidestilada Conservar a 4°C.

# 4 Aislamiento de membranas

## Amortiguador de glicina 5 mM

5 mM Glicina 150 mM NaCl 50 mM Ácido etilen glicol tetracético (EGTA) 50 mM EDTA 300 mM Sacarosa  $20 \ \mu l$  de inhibidor de proteasas (Proteasa inhibitor cocktail Sigma ®) por cada 2ml de amortiguador de glicina utilizado.

Ajustar pH a 9.0 con NaOH

# Amortiguador de glicina 200 mM

200 mM Glicina 150 mM NaCl 50 mM EGTA 50 mM EDTA 300 mM Sacarosa 20 μl de inhibidor de proteasas por cada 2ml de amortiguador Ajustar pH a 9.0 con NaOH

# 5 Electroforesis de proteínas y Western blot

#### Amortiguador de bloqueo

1x TBS 0.1% Tween 20 5X Animal Free Blocker Vector Laboratories®

## Amortiguador de carga 1x

0.6 ml 1M Tris pH 6.8
5 ml 50% Glicerol
2 ml 10% SDS
0.5 ml 2-Mercaptoetanol
0.9 ml Agua desionizada
1 ml Azul de bromofenol
Conservar a -20°C

# Amortiguador de lavado TBS/T

1x TBS

0.1% Tween 20

#### Amortiguador para electroforesis 10x

30 g de Tris 144 g de Glicina 10 g de SDS Aforar a 1L

## Azul de bromofenol 1%

100 mg de Azul de bromofenol 10 ml Agua desionizada

#### Azul de coomassie

100 ml Solución metanol: ácido acético 0.25 g de Azul de coomassie R 250

## **Glicerol 50%**

50 ml de Glicerol puro 50 ml Agua desionizada

## Persulfato de amonio 10%

0.5 g Persulfato de amonio5 ml Agua desionizada

# SDS 10%

10g SDS 100 ml Agua desionizada

## Solución de metanol: ácido acético (solución de desteñido)

500 ml Metanol 100 ml Ácido acético glacial 400 ml Agua desionizada

#### Solución de poliacrilamida

30% Acrilamida y 0.8% de Bisacrilamida 29.2 g Acrilamida 0.8 g Bisacrilamida Aforar a 100 ml de agua desionizada.

## Tris HCI (Ph 8.8) 2M 100 ml.

24.2g de Tris50 ml de Agua desionizadaAjustar pH a 8.8 con HCl y aforar a 100 ml con agua desionizada

# Tris HCI (Ph 6.8) 1M 100 ml.

12.1 g de Tris50 ml de Agua desionizadaAjustar pH a 6.8 con HCl y aforar a 100 ml con agua desionizada

## TBS (Tris buffered saline) 10x

24.2 g de Tris base 80 g de NaCl Ajustar pH a 7.6 con HCl y aforar a 1L

## 6 Inyección de membranas de células Sf9 y RNA en ovocitos de X. laevis

## **Medio Barth**

88 mM NaCl
1 mM Cloruro de potasio (KCl)
0.33 mM Nitrato de calcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)
0.41 mM Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)
0.82 mM Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>)

2.4 mM Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>)5 mM Hepes0.1 mg/ml de sulfato de gentamicinaAjustar a pH de 7.4

# Solución Ringer

115 mM NaCl
2 mM KCl
1.8 mM CaCl<sub>2</sub>
5 mM Hepes
Ajustar a pH de 7.4