

88  
zej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**Fusiones MBP - Receptor alfa 1B adrenérgico  
en E. coli**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A .

MA. TERESA LARA ORTIZ

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





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 está 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

FACULTAD DE CIENCIAS

**Fusiones MBP - Receptor alfa 1B adrenérgico  
en E. coli**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A .

MA. TERESA LARA ORTIZ

MEXICO, D. F.



1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCIÓN REGULAR

La presente tesis fue realizada bajo la dirección de la M. en C. Claudia González Espinosa y el Dr. J. Adolfo García-Saíz en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El trabajo es apoyado por donativos de CONACyT (0310-N9107) y DGAPA (IN200193).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Adolfo García-Saíñz por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio.

A Claudia González mi más sincero agradecimiento por la asesoría del presente trabajo, por su buena disposición para hacerme partícipe de sus conocimientos, por el apoyo que siempre me ha brindado y por su valiosa amistad.

A Paty por su amistad sincera y por todos y cada uno de los momentos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio Rocío, Gloria, Tere, Marta, Marina, Alberto y Gonzálo, por su ayuda en el trabajo diario y por la amistad que me han brindado.

A los Drs. Carmen Gómez, Rene Cardenas y Benito Estrada por su revisión crítica y acertados comentarios en el presente trabajo.

A Lupita Ramírez y Lupita Jimenez porque su saludo diario fue siempre una sonrisa.

A LA MEMORIA DE MI MADRE  
A QUIEN SIEMPRE LLEVARE EN MI CORAZON

CON ESPECIAL CARIÑO A MI PADRE Y HERMANO

CON TODO MI AMOR A LA PERSONA QUE SIEMPRE CREYO EN MI  
Y QUE ME A LLENADO DE CARIÑO, CARLOS.



## INDICE

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Receptores Adrenérgicos	10
Expresión de Proteínas en Sistemas Modelo	16
Sistemas de Expresión en <i>E. coli</i>	22
El Sistema de Fusión con MBP	32
OBJETIVO	35
MATERIALES Y METODOS	37
RESULTADOS	44
DISCUSION	51
CONCLUSIONES	58
LITERATURA CITADA	59

## RESUMEN

Los receptores adrenérgicos forman parte de una gran familia de receptores acoplados a proteínas G. La estructura primaria de estos receptores es muy similar y quizá la principal característica es la presencia de siete segmentos transmembranales. Estas proteínas tienen la función primordial de transmitir las señales del medio hacia el interior de la célula.

Los receptores membranales son típicamente proteínas de baja abundancia, de manera que su identificación y purificación ha sido una tarea difícil.

En el presente trabajo se muestra la posibilidad de sobreexpresar al receptor  $\alpha_1$  adrenérgico en *Escherichia coli* como una proteína de fusión (fusión con la MBP, maltose binding protein) con el objeto de obtener grandes cantidades de la proteína y utilizarla para estudios moleculares detallados.

Es importante mencionar que la purificación del receptor alfa adrenérgico aún en células que lo expresan con alta densidad, como la línea celular DDT-MF2, representa un rendimiento muy bajo (0.035  $\mu$ g de receptor/l de células) mientras que en *E. coli* la expresión que se obtiene es de 2mg de receptor/l de células.

Con el propósito de expresar el receptor alfa adrenérgico se construyeron cuatro fusiones diferentes que varían en tamaño y en la región que comprenden del receptor. Estas construcciones genéticas son: pCPst de 1670 pb que va del cuarto segmento transmembranal hasta el extremo carboxilo; pCSma de 832 pb igual que la anterior pero sin el extremo carboxilo; pp905 de 905 pb que comprende sólo los siete segmentos transmembranales y pP338 de 338 pb formada por los tres primeros segmentos transmembranales del receptor.

Inicialmente las cuatro proteínas de fusión fueron sobreexpresadas en la cepa TB1, sin embargo, el problema principal que encontramos fue la degradación proteolítica del receptor. Se tomaron dos alternativas, una utilizar inhibidores de proteasas (PMFS), con la cual no se obtuvieron resultados positivos; y la otra probar diferentes cepas, algunas de ellas deficientes en proteasas (*lon-*), esta última tampoco mejoró los resultados.

Finalmente se encontró que cambiando las condiciones de crecimiento e inducción se mejoraba notablemente el nivel de expresión del la proteína, aunque la degradación proteolítica aún se presentaba.

En resumen, los resultados obtenidos fueron: la sobreexpresión de la construcción pCSma en la cepa Y1090, crecida a 37°C a una D. O. de 0.2 e inducida posteriormente durante 4 hrs con IPTG 1 mM a 30°C. Nuestros datos muestran que las condiciones de crecimiento e inducción juegan un papel muy importante para obtener una buena expresión de la proteína de fusión, no obstante, también es importante considerar las características de la proteína que deseamos expresar así como elegir la cepa más adecuada, para evitar obtener productos de degradación.

## INTRODUCCION

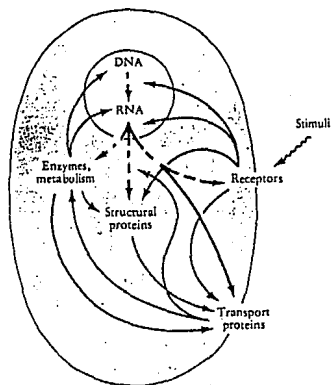
La vida puede verse como el comportamiento regular y ordenado de la materia, el cual no se basa únicamente en la tendencia de los seres vivos a ordenarse, sino que además, esta sustentada en un orden preexistente que se mantiene (Schrödinger, 1943).

Dicho mantenimiento requiere la constante realización de procesos como la biosíntesis, la degradación el transporte y el movimiento. Para que dichos procesos se coordinen se necesita una clase especial de trabajo: el trabajo "informativo".

Para poder ordenarse, la materia viva requiere información, que los seres vivos procesan en forma de moléculas cuyas estructuras en sí mismas están altamente ordenadas. Las células y organismos son capaces de convertir la energía en organización al hacer fluir dicha energía a través de sistemas celulares como membranas y complejos enzimáticos que, al igual que las moléculas encierran un alto grado de orden. Este flujo permite transformar moléculas precursoras relativamente simples en moléculas más complejas cuya utilidad se deriva precisamente de su mayor organización. Así cualquier aspecto de su arquitectura o actividad celular que contribuya a aumentar el orden, conlleva un proceso de información (Harold, 1986).

La vida de todos los organismos esta condicionada a dos tipos de información: la información genética que reciben de sus ancestros y la información ambiental que reciben del mundo que les rodea. Fig. 1.

La información genética es transmitida en forma de mensajes biológicos, los cuales son generados en los procesos de replicación, transcripción y traducción del reservorio genético de la célula, y fueron seleccionados por la evolución para asegurar la correspondencia lineal de segmentos de DNA, RNA y su proteína funcional correspondiente.



- - - → información en forma de mensajes

————→ información en forma de señales

Figura 1. Dos tipos de información biológica.

El papel fundamental de los ácidos nucleicos es el almacenamiento y transmisión de la información genética. Una secuencia de polinucleótidos definida es una hebra de información codificada; el DNA contenido en cada célula constituye el genoma del organismo. Una fracción substancial de este DNA es capaz de ser transcrito o "leído", para permitir la expresión de esta información en dirección a la síntesis de moléculas de RNA y proteínas.

La expresión de la información genética siempre involucra como primer paso la transcripción de genes en moléculas de RNA complementario al DNA. La transcripción por sí sola es suficiente para la producción de muchas moléculas de RNA funcional de la célula, por ejemplo, el RNA de transferencia o los RNA's ribosomales. Sin embargo, la síntesis de proteínas específicas es un proceso más complejo. La producción de proteínas requiere de una clase especial de moléculas de RNA usadas como intermediarios. Copias complementarias de los genes que deben ser expresados se transcriben del DNA en forma de RNA mensajero. Los RNA's mensajeros son leídos por partículas subcelulares llamadas ribosomas que actúan como una maquinaria sintetizadora de proteínas de la célula. Este proceso se conoce como traducción y las proteínas que se producen son las principales moléculas estructurales y funcionales en la mayoría de las células (Mathews et al, 1990).

Sin embargo, la información genética por sí sola no es suficiente para permitir a un organismo aún unicelular, sobrevivir en el medio ambiente. Los organismos deben ser capaces de sentir los cambios ambientales continuamente, interpretar estas sensaciones y producir las respuestas biológicas adecuadas.

Este es otro tipo de información que los organismos procesan en forma de señales químicas. La comunicación química es la forma de intercambio de información más primitiva. Un ejemplo muy sencillo, es la respuesta quimiotáctica de una bacteria; ella es capaz de sentir y nadar hacia las fuentes de alimento así como alejarse de las condiciones perniciosas.

En los organismos plúricelulares esta situación resultó mucho más compleja. La división de trabajo entre sus células tuvo como resultado la formación de tejidos específicos y de órganos, cada uno de los cuales con una función particular. Para ello fue necesario la presencia de sistemas de comunicación interna que coordinaran y regularan las actividades de los varios tipos celulares que conforman el organismo. Dicho sistema esta constituido por el sistema endócrino y el sistema nervioso, los cuales se encuentran íntimamente relacionados a nivel del hipotálamo y la pituitaria que sirven para integrar los dos sistemas en una unidad de control funcional (Wilson, 1989). La función de puente del hipotálamo esta mediada por células que presentan propiedades de células nerviosas y de células endócrinas, tienen prolongaciones nerviosas que transmiten impulsos eléctricos pero liberan a la sangre moléculas de señalización, por esta razón reciben el nombre de células neurosecretoras (Alberts et al, 1987).

Las señales pueden ser clasificadas de acuerdo a la distancia sobre la cual ellas actúan:

En las señales endócrinas, las células de las glándulas de secreción interna liberan hormonas al torrente circulatorio de manera que la substancia señal actúa a una distancia determinada de las células blanco.

En las señales parácrinas, la célula blanco está muy cercana a la célula señaladora y la señal afecta sólo al grupo de células blanco adyacentes a ella. La conducción de un impulso eléctrico de una célula nerviosa a otra o de una célula nerviosa a una célula muscular involucra señales químicas llamadas neurotransmisores. Los neurotransmisores y las neurohormonas son ejemplos de señales parácrinas.

En las señales autócrinas, las células responden a substancias que ellas mismas liberan. Un ejemplo, claro son los factores de crecimiento liberados durante el desarrollo celular; aunque generalmente son referidos a condiciones patológicas, cuando dichos factores de crecimiento son sintetizados y liberados en

forma irregular e inapropiada por las células tumorales, dando lugar a un crecimiento anormal de las propias células y de las células adyacentes.

Luego entonces, las células reciben información de su entorno gracias a moléculas extracelulares llamadas hormonas. Estas hormonas por su naturaleza química pueden dividirse en:

- a) Esteroides, pequeñas moléculas lipofílicas que difunden a través de la membrana plasmática e interactúan con receptores citosólicos o nucleares, por ejemplo, progesterona y testosterona.

- b) Prostaglandinas, grandes moléculas lipofílicas que se unen a receptores de la membrana plasmática, por ejemplo, PGA y PGB.

- c) Hormonas peptídicas, moléculas hidrofílicas que actúan uniéndose a receptores de la superficie celular, esta clase de hormonas incluye grandes péptidos tales como la insulina, los factores de crecimiento y el glucagon.

- d) Catecolaminas, pequeños componentes cargados, derivados del aminoácido de tirosina, como la epinefrina y la norepinefrina (Darnell et al, 1986).

## RECEPTORES

La capacidad de una célula para responder a una molécula de señalización extracelular determinada depende de la presencia de unas proteínas denominadas receptores, que se unen específicamente a la molécula señal u hormona.

El concepto de 'receptor' tiene su origen en los trabajos de Langley en 1906, quienes notaron que el veneno curare inhibía la contracción inducida por nicotina del músculo esquelético. La competencia entre estas dos sustancias los llevó a concluir que el mutuo antagonismo del curare y la nicotina sobre el músculo solo se puede explicar satisfactoriamente si se supone que ambos se combinan con una misma sustancia receptora, la cual recibe el estímulo, y al transmitirlo causa la contracción del músculo. No

fue sino hasta las últimas décadas que se habló de receptores como entidades bioquímicas concretas.

Las funciones fundamentales de un receptor son dos: 1) reconocer a la sustancia mensajera, es decir, a la hormona, de entre miles de otras sustancias y 2) participar como un elemento dinámico en la secuencia de eventos que llevan al efecto final de la hormona (García-Saíñz, 1988).

### **ADRENALINA**

Las catecolaminas son sintetizadas en la glándula adrenal así como en ciertas células del sistema nervioso de manera que pueden ser clasificadas como hormonas o neurotransmisores. En ambos casos estas hormonas son almacenadas dentro de vesículas en la células y liberadas cuando se necesitan, la catecolamina mejor conocida es la adrenalina o epinefrina.

La adrenalina fue descubierta en 1895 por Oliver y Shafer en extractos de glándula suprarrenal. Posteriormente Stolz y Dakin identificaron su estructura química y finalmente fue sintetizada. Se forma a partir del aminoácido tirosina principalmente en la médula de la glándula suprarrenal y en las neuronas simpáticas. Funciona, por lo tanto, como hormona y como neurotransmisor. La noradrenalina es un producto de la biotransformación de la adrenalina. En realidad ambos compuestos se encuentran tanto en las neuronas como en las suprarrenales. Sin embargo, en general se acepta que la adrenalina es la hormona y la noradrenalina el neurotransmisor (García-Saíñz, 1987).

La adrenalina ejerce importantes funciones en todo el cuerpo. Representa un mediador en situaciones de emergencia al modular el metabolismo de carbohidratos proporcionándonos una fuente de energía disponible, la cual puede ser quemada rápidamente para dar una respuesta de 'huida o de pelea'. Así, las respuestas iniciales en varios tejidos son: incremento en la glucogenólisis y



gluconeogénesis en el hígado, glucólisis incrementada en el músculo esquelético, elevación de la presión sanguínea, vasoconstricción, conversión de triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol en el tejido adiposo, secreción de amilasa incrementada en glándula salival y relajación del músculo uterino (Norman, 1987).

## **SISTEMAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES**

Como podemos ver, la mayoría de las hormonas en último término influyen sobre las células blanco, ya sea alterando las propiedades o las velocidades de síntesis de las proteínas existentes o bien iniciando la síntesis de otras nuevas.

Para que esto sea posible las señales extracelulares deben ser transformadas en señales internas, mediante un proceso denominado transducción, que comprende desde el momento de la activación del receptor hasta la formación del segundo mensajero.

Uno de los sistemas más comunes a través del cual los receptores de la superficie celular generan señales intracelulares involucra cuatro componentes principales: la hormona, un receptor activado, una proteína transductora denominada proteína 'G' por requerir para su funcionamiento nucleótidos de guanina y un efector membranal.

### **A) SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA**

Este sistema fue descrito por primera vez por los trabajos de Sutherland y Rall a finales de los años cincuentas, cuando estudiaban la acción de la adrenalina y el glucagon sobre la transformación del glucógeno en glucosa en células hepáticas (Sutherland, 1972).

La aportación más valiosa de los estudios realizados por estos investigadores fue demostrar que al tratar membranas aisladas de

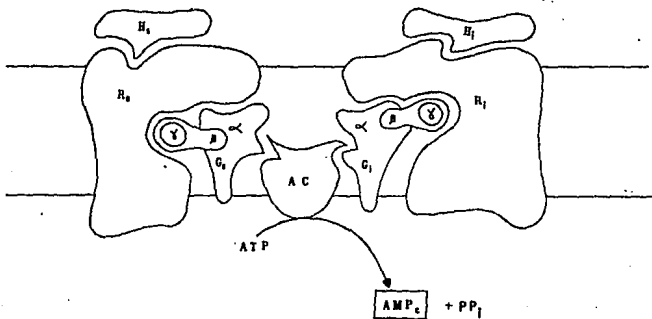
hepatocitos con epinefrina (en presencia de ATP) se inducía la producción de un pequeño mediador que podía sustituir a la hormona activando a la glucógeno fosforilasa. El mediador fue identificado en 1959 como AMP cíclico (Alberts et al, 1987).

La transmisión de mensajes mediados por AMP cíclico a través de la membrana, consiste en: la activación del receptor, vista como un cambio conformacional que le permite interactuar con la proteína 'G' acopladora, sensibilizándola al GTP, que a su vez activa una enzima, la adenilato ciclasa, localizada en la superficie interna de la membrana, que cataliza la reacción de conversión de ATP en AMP cíclico (Berridge, 1987). Cabe mencionar que existen varios tipos de proteínas 'G', algunas de ellas actúan sobre la enzima adenilato ciclasa, en forma activatoria, llamadas  $G_s$ , otras lo hacen en forma inhibitoria llamadas  $G_i$  (García-Saíenz, 1987). Fig. A.

Incrementar los niveles de AMP cíclico sirve para activar un tipo de enzima específico, una proteína cinasa. Una cinasa es una enzima que transfiere un fosfato de un donador (generalmente ATP) a un aceptor (otra proteína). La modificación de una proteína por una unión covalente de un grupo fosfato tiene un efecto importante sobre su actividad, inhibiéndola o activándola.

## B) SISTEMA FOSFOINOSITIDOS - CALCIO

Al igual que el AMP cíclico, el calcio libre intracelular, parecían ser el producto de la transducción de señales a través de la membrana. En 1947, se demostró que la inyección intracelular de una pequeña cantidad de calcio provocaba la contracción de la fibra del músculo esquelético (Mathews et al, 1990). No fue sino hasta 1975 que Robert Michell advirtió una fuerte correlación entre la capacidad de una señal externa para estimular el recambio de fosfatidilinositol y la movilización de calcio dentro de la célula (Berridge, 1987).



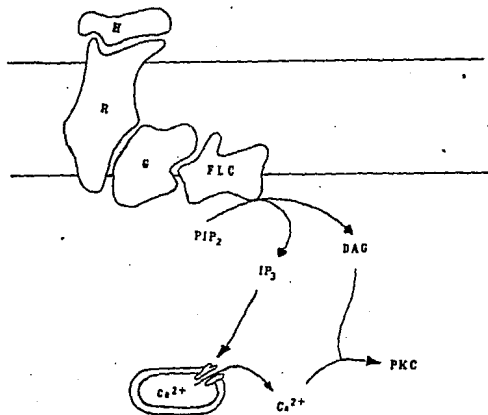
**Figura A. SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA**

Las abreviaturas empleadas son:  
 H<sub>s</sub> hormona estimulante, R<sub>s</sub> receptor activador,  
 G<sub>s</sub> proteína G acopladora, AC Adenilato Ciclasa,  
 R<sub>i</sub> receptor inhibidor, AMP<sub>c</sub> adenosina-3-5-  
 monofosfato cíclico.

Ahora conocemos claramente el mecanismo de transducción: la hormona al interactuar con su correspondiente receptor, induce la hidrólisis de un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato ( $PIP_2$ ) por la activación de la enzima fosfolipasa C a través de una proteína G denominada  $G_q$ . Los productos de la hidrólisis del  $PIP_2$ : el mio-inositol 1,4,5 trisfosfato ( $IP_3$ ) y el 1,2 diacilglicerol (DAG) funcionan como mensajeros intracelulares. Fig. B.

El  $IP_3$ , cuya naturaleza hidrosoluble le permite difundir hacia el citoplasma celular e interactuar con receptores localizados en la superficie del retículo endoplásmico, produce la apertura de un canal que promueve la liberación de calcio de este organelo, provocando un aumento en la concentración de calcio citosólico.

El otro producto de la hidrólisis del  $PIP_2$ , el diacilglicerol, un compuesto hidrofóbico que permanece unido a la membrana, se encarga de activar directamente la proteína cinasa C, encargada de fosforilar diversas proteínas.



**Figura B. SISTEMA DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO**

Las abreviaturas empleadas son:  
 H hormona, R receptor; G proteína G acopladora,  
 FLC fosfolipasa C, PIP<sub>2</sub> fosfatidil inositol  
 bifosfato, IP<sub>3</sub> inositol trifosfato, DAG  
 diacilglicerol, PKC proteína cinasa C.

## 1. RECEPTORES ADRENERGICOS

Las acciones del neurotransmisor norepinefrina y de la hormona epinefrina son mediadas por receptores adrenérgicos.

El concepto de distintos receptores adrenérgicos fue desarrollada por Ahlquist, quien en 1948, reportó dos diferentes rangos de ordenes de potencia de distintas drogas en varios sistemas efectoros. Se dedujo que estos ordenes de potencia correspondían a dos subtipos diferentes de receptores, clasificados como  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos (Harrison et al, 1991). Pocos años más tarde, Berthelsen y Pettinger, propusieron que los receptores  $\alpha$  podrían ser subclasificados: el receptor del músculo liso vascular que media la contracción fue denominado  $\alpha_1$ , mientras que el receptor presináptico fue definido como  $\alpha_2$ , (Fain and García-Sainz, 1980).

Evidencias recientes sugieren, sin embargo, que los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos no tienen las mismas propiedades en todos los tejidos. La existencia de distintos subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ha sido sustentada en estudios de unión de radioligando, lo que ha dado origen a una definición consistente de subtipos de receptor  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  (Minneman, 1988),  $\alpha_{1C}$  (Perez et al, 1991).

Las técnicas de unión de radioligando han sido una herramienta muy útil para la caracterización farmacológica de la familia de receptores adrenérgicos. Sin embargo, el surgimiento de los estudios en biología molecular no solo han confirmado la clasificación de estos receptores sino que además ha dado la oportunidad de realizar estudios estructurales y funcionales de los receptores adrenérgicos.

La reciente purificación de estos receptores y la clonación de sus genes ha permitido obtener una amplia información concerniente a su estructura y función. Los distintos subtipos de receptores difieren no sólo en la especificidad de unión al ligando, sino también en estar acoplados a diferentes proteínas 'G' y en inclinarse a tener diferentes sistemas de segundo mensajero.

Todos estos receptores tienen la característica de estar constituidos por siete segmentos de 20 a 28 aminoácidos hidrofóbicos, los cuales potencialmente representan  $\alpha$ -hélices que atraviesan la membrana. Dentro de estos dominios transmembranales los receptores adrenérgicos tienen una considerable identidad en la secuencia de aminoácidos (Roth *et al*, 1986).

Fuertes evidencias sugieren que las regiones transmembranales están involucradas en la unión de los ligandos adrenérgicos. Diversos estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que las deleciones en las asas hidrofílicas citoplásmicas y extracelulares, no inducen ningún cambio en la unión al ligando, mientras que las deleciones dentro de los dominios hidrofóbicos sí alteran el pegado. En particular, el sexto y séptimo dominio transmembranaral determinan la especificidad de unión de estos receptores (Lefkowitz *et al*, 1988). Se ha demostrado que dos residuos de serina en el quinto dominio transmembranaral de los receptores adrenérgicos, están probablemente involucradas en la unión por puentes de hidrógeno del grupo catecol de las catecolaminas. Es interesante que estos dos residuos de serina están absolutamente conservados en todos los receptores a catecolaminas que han sido clonados (Strader *et al*, 1989).

Todos los receptores tienen sitios de glucosilación en su grupo amino terminal, el cual se presume extracelular, mientras que su terminación carboxilo parece ser citoplasmática. Las regiones de mayor diversidad entre los diversos subtipos de receptores son: la terminación amino extracelular, la tercer asa citoplasmica y la terminación carboxilo. Estas dos últimas son variables en longitud y composición (Roth *et al*, 1986).

El mayor interés, así como también la mayor parte de las especulaciones, se han enfocado a la tercer asa citoplasmática, la cual está involucrada en el acoplamiento de los receptores a las proteínas 'G'. Por otra parte, dicha asa, junto con la terminación carboxilo, poseen residuos de serina y treonina, quienes son sitios blanco de fosforilación, el cual es un mecanismo regulador de las

funciones del receptor. Estas últimas son las únicas regiones estructurales de los receptores que muestran variaciones significativas en longitud (Lefkowitz et al, 1988).

### 1.1 RECEPTOR ADRENERGICO $\alpha_{1B}$

El receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico es un miembro de la familia de receptores transmembranales. La activación de este receptor por catecolaminas afecta una variedad de funciones celulares tales como la contractilidad en el músculo liso y cardíaco y la glucogénesis en el hígado a través de mecanismos dependientes de Calcio (Kunos, 1984).

El receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$  ha sido identificado como una glucoproteína membranal de aproximadamente 80 KDa. El inserto de 2 Kb del cDNA clonado, correspondiente a la proteína del receptor, fue aislado de una línea celular de hamster DDT1 MF-2, mostrando tener las características del subtipo  $\alpha_{1B}$  definido farmacológicamente (Cotecchia et al, 1988). El gene que codifica para el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico contiene por lo menos un intrón. Hibridizaciones *in situ* del cDNA, pruebas genómicas para cromosomas humanos en metafase, han localizado el gene del receptor en el cromosoma 5 en la región 5q32-34 (Lomasney et al, 1991).

La secuencia de aminoácidos obtenida del cDNA, codifica para un polipéptido de 515 aminoácidos con un peso molecular de 56 KDa, la diferencia con el peso arriba mencionado, corresponde a modificaciones postraduccionales del receptor. Tales modificaciones consisten en la adición de oligosacáridos a residuos de asparagina presentes en la terminación amino del receptor.

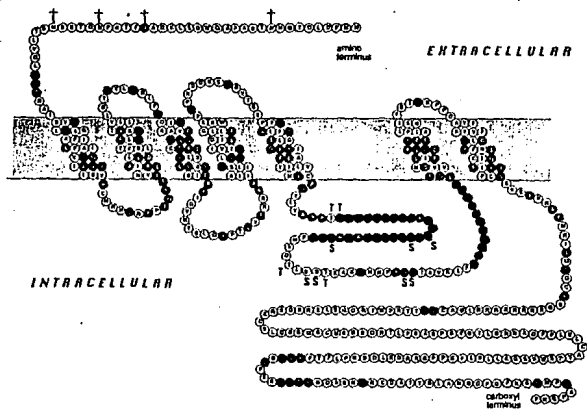
Otra característica estructural del receptor  $\alpha_{1B}$  incluye la presencia de un sitio potencial para la palmitoilación en la terminación carboxilo. Se ha sugerido que la palmitoilación de estos receptores, podría servir para anclar esta región del receptor a la membrana plasmática, permitiendo una conformación



adecuada para el acoplamiento con la proteína "G" (Roth *et al*, 1986).

Estudios de mutagénesis, delección de secuencias específicas, así como construcción y expresión de receptores adrenérgicos quiméricos, indican que la tercer asa intracelular confiere al receptor  $\alpha_{1B}$  la habilidad para estimular a la fosfolipasa C (Lefkowitz, *et al* 1988). La activación de la fosfolipasa C se logra mediante una proteína G acopladora, perteneciente a la familia Gq (Wu *et al*, 1992). El receptor  $\alpha_{1B}$  se une a la proteína G a través de una secuencia de 27 aminoácidos (residuos 233-259) pertenecientes a la porción N-terminal y los residuos 285-295 de la región C-terminal de la tercer asa citoplasmática (Cotecchia *et al*, 1992).

La tercer asa intracelular del receptor  $\alpha_{1B}$  es de una longitud intermedia comparada con la del receptor  $\beta$  (que es más corta) o con la del  $\alpha_2$  (más larga), mientras que la terminación carboxilo es la más larga de la familia de los receptores adrenérgicos. Varios residuos de serina y treonina presentes en el asa intracelular y en la terminación carboxilo son sitios potenciales para la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$  por la proteína cinasa C y A (Lefkowitz *et al*, 1991). Fig. 2.



**Figura 2.** MODELO DE SIETE SEGMENTOS TRANSMEMBRANALES DEL RECEPTOR  $\alpha_2$ -ADRENERGICO DE HAMSTER.

Los dominios transmembranales fueron definidos por análisis de hidrofobicidad. Los sitios potenciales de glucosilación están indicados con cruces y los sitios potenciales de fosforilación con las letras T (treonina) y S (serina). Las dos regiones de los círculos oscuros continúan indican los posibles sitios de interacción con la proteína G y con la Fosfolipasa C.

## 1.2 CARACTERIZACION TRADICIONAL DE RECEPTORES

La identificación y purificación de receptores a hormonas es una tarea difícil, principalmente por que ellos estan presentes en cantidades mínimas. Típicamente, la superficie de una célula tiene de 10 000 a 20 000 receptores para adrenalina, pero esta cantidad es sólo aproximadamente una millonésima de la proteína total en la célula o aproximadamente una diezmilésima de la proteína de la membrana plasmática (Darnell et al, 1986).

El método más ampliamente usado para la detección de receptores así como para el estudio sobre la interacción hormona-receptor, es un ensayo funcional en el que se utiliza la interacción *in vitro* de receptor, hormona marcada radioactivamente y hormona sin marcar. El concepto básico de este ensayo, consiste en que bajo las condiciones apropiadas, una hormona radioactiva (H) y un receptor (R) se asocian dando el receptor con la hormona (HR) (Ruffolo, 1987).



Como podemos ver este comportamiento es muy similar al de una enzima con su sustrato; y efectivamente la interacción hormona-sustrato presenta una cinética enzimática Michaeliana debido a que la respuesta biológica a una hormona es un fenómeno saturable. El punto de saturación es igual al número de sitios de receptor.

El acoplamiento preciso entre la hormona y su receptor específico se describe o se mide en terminos de afinidad (K).

$$\text{Afinidad} = K = \frac{[HR]}{[H][R]}$$

La habilidad de una hormona cuando se une a un receptor para dar una respuesta biológica se denomina 'actividad intrínseca' de la hormona. Todas las hormonas activas tienen actividad intrínseca mayor a cero, y son referidas como 'agonistas'. Las substancias que se pegan al receptor pero no lo activan (actividad intrínseca = 0) son designados antagonistas.

Con el ensayo de 'binding' (unión), se pueden llevar a cabo por lo menos tres experimentos básicos: experimentos de saturación, experimentos de inhibición y experimentos de cinética.

Aquí sólo hablaremos de los experimentos de saturación, mejor conocidos como ensayo competitivo de ligando. En este ensayo, una vez que se lleva a cabo la reacción, la preparación de membranas o células completas es separada del medio de reacción mediante filtración y la radioactividad asociada con las membranas o con las células totales es contada como 'unión total'. La porción de radioactividad en las membranas o células que se unió a los receptores específicos es designada 'unión específica', representa el componente saturable del pegado y varía con la concentración de la hormona. El remanente de la radioactividad que está asociado con la membrana o las células se denomina 'unión inespecífica', representa un componente insaturable, es la porción del pegado total que se presenta aún cuando hay un exceso de hormona sin marcar. En cada concentración de hormona el pegado específico es igual al pegado total menos el pegado no específico (Wilson & Foster, 1985).

Con base en estos estudios y en la especificidad de orden de afinidades a diferentes compuestos químicos (agonistas, antagonistas) se han podido discernir distintos tipos y subtipos de receptores adrenérgicos.

## 2. EXPRESION DE PROTEINAS EN SISTEMAS MODELO

En los últimos 13 años, la manipulación de DNA *in vitro* se ha desarrollado de la transferencia de información entre organismos procariontes a una tecnología que facilita la producción eficiente y controlada de proteínas en hospederos foráneos. Una característica importante de estos desarrollos es la habilidad de expresar genes eucariontes en procariontes (Marston, 1986).

Los receptores membranales son típicamente proteínas de baja abundancia, con una enorme importancia en la transducción de las señales que provienen del exterior y que alteran el ambiente intracelular. La aplicación de las técnicas de clonación molecular han ampliado nuestro conocimiento sobre la secuencia primaria de estas proteínas, así como de receptores membranales cuya baja abundancia impide la purificación de la molécula entera (Bahouth et al, 1991).

Diversos receptores acoplados a proteínas G han sido expresados en la bacteria *Escherichia coli* o en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las propiedades farmacológicas (selectividad al ligando, estereoespecificidad y orden de afinidades de pegado) de estos receptores en membranas microbianas son muy similares a las propiedades desplegadas en tejido de mamífero o en células transfectadas con genes de receptores clonados (Strosberg & Marullo, 1992).

### 2.1 BACTERIAS

Las bacterias han llegado a ser organismos experimentales útiles para la expresión y estudio de una amplia variedad de productos génicos eucariontes tanto para la investigación básica como para las aplicaciones industriales y farmacéuticas.

La habilidad para expresar genes eucariontes en procariontes tales como *Escherichia coli* se debe en parte, a las grandes ventajas que este organismo presenta, tales como: tasas de crecimiento muy altas; al multiplicarse las bacterias producen millones de copias de sus propios genes y del gen foráneo en ellas introducido, medios de cultivo sencillos líquidos o sólidos y una gran facilidad para ser transformados con diversos vectores que lleven el inserto.

*E. coli* posee dos membranas, la membrana externa o pared celular y la membrana citoplásmica, las cuales están separadas por un espacio periplásmico; por lo que las proteínas hospederas podrían ser expresadas en el citoplasma o secretadas a través de la membrana celular a dicho espacio periplásmico. Sin embargo, muy pocas proteínas en *E. coli* son secretadas al medio extracelular a través de la membrana externa. En general, los polipéptidos recombinantes se acumulan en altos niveles de proteína celular total cuando son expresados intracelularmente más que cuando son secretados, pero muchos de los productos polipeptídicos localizados en el citoplasma, son insolubles y forman agregados.

Existe un número de modificaciones postraduccionales eucarióticas de los polipéptidos que *E. coli* no realiza. Estas incluyen glucosilación, acetilación y amidación. Hay sin embargo, ejemplos documentados de proteínas recombinantes sintetizadas en *E. coli* las cuales son biológicamente activas a pesar de no estar glucosiladas. Estos resultados no solo demuestran que los residuos de carbohidratos no son esenciales para la actividad biológica, sino también que cuando el producto expresado es insoluble, ellos no son esenciales para el doblamiento de la proteína (Marston, 1986).

Por otra parte, la ausencia de receptores endógenos en *E. coli*, le confiere una ventaja más como sistema de expresión, debido a que sólo expresará los receptores que sean clonados en los plásmidos con los que la bacteria sea transformada.

## 2.2 LEVADURAS

Las levaduras como organismos unicelulares presentan las mismas ventajas de manipulación aplicadas a las bacterias. Las levaduras tienen una tasa de crecimiento muy rápido y pueden crecer a muy altas densidades celulares, pueden ser propagadas en medio definido simple y pueden ser transformadas con una variedad de vectores plasmídicos. Una amplia variedad de técnicas bioquímicas, genéticas y moleculares han sido desarrolladas para el uso de estos organismos (Grossman *et al.*, 1987).

A diferencia de las bacterias, las levaduras son eucariontes, poseen mucha de la compleja biología celular típica de organismos multicelulares, incluyendo una alta compartimentalización y una elaborada vía secretora, la cual media la secreción y modificación de muchas proteínas hospedadas. Se han desarrollado vectores designados para una expresión eficiente de genes heterólogos, los vectores emplean elementos promotores derivados de la alcohol deshidrogenasa, fosfoglicerato cinasa, ácido fosfatasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y galactocinasa. Estos promotores, en general, resultan en una transcripción eficiente de los genes heterólogos. Los vectores de expresión en levaduras, pueden ser episomales o pueden estar integrados al genoma de la levadura, en donde ellos podrían estar presentes en un número de copias controlado y exhibiendo un alto grado de estabilidad mitótica (Grossman *et al.*, 1990).

La fusión de genes es una herramienta útil para el análisis de la expresión, regulación y estructura de un gen. Las fusiones de genes necesariamente deletan secuencias de DNA que son interiores a la estructura del gen de interés y por lo tanto pueden ser usadas para determinar la posición de algún sitio interno que pudiera ser esencial para la expresión del gene. La proteína más comúnmente usada para la fusión de genes ha sido la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Hay varias ventajas para esta enzima.

Los ensayos para su actividad son sencillos, tanto en el ensayo de placa, en donde las colonias expresadas son coloreadas, como en un ensayo en extracto celular como una forma cuantitativa de medir la enzima. Esta metodología ha sido posible aplicarla a levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Grossman et al, 1983).

### 2.3 BACULOVIRUS

El baculovirus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (ACNPV) ha mostrado ser adecuado como un vector de expresión viral debido a los grandes niveles de producción de proteínas de mamíferos en cultivo de células de insecto Sf9.

La línea celular más comúnmente usada, Sf9, es derivada del tejido de la polilla *Spodoptera frugiperda*, y el baculovirus más estudiado para la producción de proteínas, es el MNPV originalmente aislado de *Autographa californica*, un lepidóptero (el cual en estado adulto es una polilla nocturna) (Miller, 1988).

La estrategia de clonación, involucra la construcción de vectores que lleven el gen foráneo bajo el control del promotor polihedrina. Este vector es introducido junto con el DNA del baculovirus de tipo silvestre por transfección, en la línea celular Sf9. La recombinación homóloga resulta en la substitución del gene polihedrina en el virus con el gene foráneo en el vector de transferencia. Los virus recombinantes que acarrean un gen foráneo bajo el control del promotor de polihedrina pueden ser distinguidos de los virus de tipo silvestre usando un microscopio de luz (Rudy & Iversson, 1992). Debido a que la infección es lítica, las células no necesitan crecerse por largos períodos de tiempo, constantemente expresan grandes cantidades de la proteína que podrían deteriorar el crecimiento celular o la viabilidad. La infección por el baculovirus de tipo silvestre produce dos tipos de virus: el virus extracelular que brota de la membrana celular infectada y el virus intracelular que forma gránulos refráctiles, alargados en unión con una proteína viral llamada polihedrina.



Estos granulos se denominan cuerpos de oclusión o polihedra. La polihedra protege a las partículas virales del ambiente después de que el organismo infectado muere. Debido a que el gene de polihedrina esta involucrado sólo en la producción de la forma intracelular del virus, el gene puede ser deletado sin impedir la producción del virus extracelular. Esta característica del virus, así como su habilidad para infectar células en cultivo, es la base del desarrollo de estos vectores (O'Reilly et al, 1992).

El baculovirus como sistema de expresión ha cobrado enorme importancia en los últimos años debido a la gran cantidad de proteína foránea producida en células de insecto. La producción de proteína puede ser hasta de 500 mg/l de células para proteínas solubles y de 150 mg/l para proteínas membranales. Las células de insecto, como organismos eucariontes superiores, producen a las proteínas foráneas correctamente plegadas.

Como con otros sistemas de expresión, la habilidad del sistema de baculovirus para proporcionar cantidades abundantes de alguna proteína foránea en particular, tendrá que ser determinado empíricamente, ya que muchos aspectos de la expresión de un gen foráneo y la estabilidad de la proteína no son conocidos en este momento.

## **2.2 CULTIVO DE CELULAS**

La clonación de DNA en células de mamífero se originó de observaciones en las que al presentar a las células DNA viral, sin cubierta proteica, desnudo, un pequeño número de ellas experimentaban dentro un ciclo de vida viral. A este fenómeno se le denomino transfección. Para los biologos moleculares, la transfección de DNA en células de mamífero ha sido invaluable para el entendimiento de los mecanismos de expresión de genes. Este conocimiento ha sido útil para generar líneas celulares alteradas

las cuales producen grandes cantidades y actividad máxima de un producto proteico particulár.

En primera instancia el 100% de las células adsorben el DNA fuera de sus membranas y entra a la célula probablemente por un mecanismo fagocítico. En general, templados de DNA llegan a ser cortados y subsecuentemente linearizados en un período de 48 hrs. Dentro de este tiempo, muchas copias de DNA se presentan y existen en estado episomal (extracromosomal). Después de unos pocos días, la expresión decrece, presumiblemente debido a la pérdida de copias extracromosomales, las cuales son incapaces de replicarse y segregarse en una población de células en división. Sin embargo, una pequeña proporción de estas copias son capaces de integrarse en el genoma de las células hospederas, donde ellas llegan a ser una unidad genética heredable estable. Generalmente la integración ocurre en sitios azarosos en el genoma y se presentan copias multimericas del DNA. Sin embargo, las técnicas de transfección tienden a favorecer la integración de copias únicas en una frecuencia en la cual la integración en sitios homologos puede ser detectada.

La transfección eficiente de las células ha sido incrementada por el uso de facilitadores, métodos que son comúnmente viables para introducir DNA en las células tales como la coprecipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextran, electroporación, fusión de protoplastos y microinyección. La mayoría de las células responden mejor a una u otra técnica en particular, lo cual ha sido determinado empíricamente.

La elección de una línea celular es un punto muy importante para la obtención de buenos resultados en la producción de la proteína foránea. Entre las más susceptibles estan: las células Hela humanas y las células L de ratón (Walker & Gingold, 1988).

### 3. SISTEMAS DE EXPRESION EN *Escherichia coli*

#### 3.1 EL PROMOTOR DE TRIPTOFANO

Los promotores son secuencias de DNA que son necesarias para la transcripción. En *E. coli* la RNA polimerasa reconoce al promotor como el primer paso en la síntesis de RNA. Y los sitios a los cuales se une el represor se llaman operadores.

Para obtener la expresión de una secuencia de DNA eucariote en *E. coli* es necesario colocar la secuencia codificada en dirección 3' de un promotor bacteriano. Los promotores más comúnmente usados son aquellos que provienen de los operones *lac* o *trp* (o una combinación de los dos llamado promotor 'tac') (Walker & Gingold, 1988).

El operón de triptofano contiene cinco genes estructurales que codifican para las tres enzimas que se encargan de la síntesis de triptofano a partir del ácido chorísmico (Devlin, 1989). El operón de triptofano siempre está encendido a menos que sea reprimido por la presencia de pequeñas moléculas de correpresor (triptofano). Por ello se dice que el operón de *Trp* se reprime, más no se induce como en el caso del operón de lactosa. Cuando el operón de *Trp* comienza a transcribirse se dice que está desreprimido. De manera que, en ausencia de *Trp* (co-represor) la RNA polimerasa se une a la región promotora y transcribe los genes estructurales del operón. En presencia de *Trp*, el complejo co-represor/represor se une a la región operadora y previene la unión de la RNA polimerasa al promotor (Gardner et al, 1984).

Otro elemento de control importante del operón de *Trp* que no se presenta en el operón de *lac* es un sitio de atenuación. La región de atenuación proporciona a la RNA polimerasa una segunda oportunidad para parar la transcripción de las enzimas para sintetizar *Trp* que la célula no necesita. En la presencia de *Trp*, la región de atenuación actúa al igual que un sitio de terminación de la transcripción.

El mecanismo molecular por el cual la transcripción se termina en el sitio de atenuación es un ejemplo claro de la interacción cooperativa entre la transcripción y la traducción bacteriana para alcanzar los niveles deseados de un RNA mensajero determinado (Devlin, 1989).

Por lo tanto, ambos, el operador y el atenuador del triptofano ejercen la misma influencia general. En el caso del operador, éste participa en la represión de la transcripción, y en el caso del atenuador, éste participa en la terminación de la transcripción por aquellas RNA's polimerasas que han escapado de la represión.

Como podemos ver, el promotor para el operón de triptofano de *Escherichia coli* ha sido usado ampliamente para la expresión de genes heterólogos debido entre otras características por ser tan bien conocido. Segundo, es un promotor fuerte, y los genes transcritos por este promotor frecuentemente resultan en la acumulación de niveles del 2-30% de proteína celular total. Tercero, su nivel basal de expresión es razonablemente bajo. Esto generalmente evita problemas que pueden ocurrir debido a los altos niveles de expresión constitutiva de proteínas foráneas, así como al crecimiento lento de las células, la acumulación de deleciones y la acumulación de células que han perdido el plásmido. Cuarto, la expresión de vectores que usan este promotor pueden ser transferidos a casi cualquier cepa de *E. coli*. Esto tiene la ventaja de que facilita el poder inspeccionar una gran número de cepas de *E. coli* que poseen propiedades deseables. La última característica es que la inducción de este promotor es muy simple, ya sea en botellas con agitación o en fermentadores (Goeddel, 1990).

Existen algunos problemas con los que uno podría encontrarse al realizar la expresión de una proteína en *E. coli*, los cuales no son específicos para el promotor de triptofano. Estos incluyen la carencia de una iniciación adecuada de la traducción y la degradación de proteínas. Ciertas proteínas son tóxicas para las células aún en bajos niveles de expresión. El DNA que codifica para

tales proteínas puede ser difícil de colocarse hacia el extremo 3' del promotor de triptofano y las células que contienen el plásmido resultante, generalmente crecen pobremente. Finalmente, un alto número de copias de plásmido que usan el promotor de triptofano, no serán regulados debido a la carencia de suficiente represor *trp* y una estrategia para incrementar los niveles del represor *trp* podría ser necesaria para regular la expresión de tales plásmidos.

La tasa de inducción en un plásmido como el pBR322 es aproximadamente de 50 veces. La inducción del promotor de *trp* esta acompañada de un ayuno de triptofano en los cultivos de *E. coli* que contienen un plásmido de expresión. Dependiendo de la proteína que va a ser expresada, algunas cepas de *E. coli* podrían producir más de una proteína específica que otras, y por lo tanto uno desearía probar varias cepas (Goeddel, 1990).

### 3.2 FUSIONES GENICAS

La tecnología de DNA recombinante ha permitido fusiones *in vitro* de genes o fragmentos de genes de una manera sencilla y predecible. Las fusiones de genes fueron usadas en los primeros sistemas descritos para expresión bacteriana heteróloga de pequeños péptidos, tales como la somatostatina y la insulina (Goeddel, 1990).

La mayoría de las fusiones involucran el empalme del gen recombinante directamente después de la secuencia señal adecuada. Es decir, la región control y la secuencia que codifica para el extremo amino de un gen de *E. coli* es ligada a la secuencia de interés; de manera, que cuando se introduce y clona el gen en *E. coli*, la RNA polimerasa reconocerá al promotor como nativo y transcribirá al gen. La terminación 5' del RNA mensajero también es nativa y como consecuencia interactuará en forma normal con el ribosoma para comenzar la síntesis de proteínas. La proteína que resulta será quimérica, la terminación amino será derivada de un

gen procarionte y la terminación carboxilo de un gen eucarionte. Una ventaja de esta estrategia es que si el péptido señal es correctamente procesado durante el transporte, es posible producir proteínas recombinantes con el grupo terminal amino nativo. Esto fue posible, por ejemplo, en la producción de la hormona de crecimiento humano en *E. coli* usando la secuencia señal de la fosfatasa alcalina (Gray, 1985). Hay varias razones para el uso de fusiones de genes para la expresión de proteínas recombinantes en hospederos heterólogos. Primero, el gen foráneo puede ser localizado bajo el control de sistemas de represión/inducción denominados promotores y operadores de *E. coli*. Segundo, las proteínas foráneas son frecuentemente degradadas por las proteasas hospederas, y esto podría algunas veces ser evitado por una estrategia de fusión de genes. Tercero, diseños de purificación eficiente podrían ser obtenidos, los cuales permitieran una rápida recuperación de los productos génicos. Cuarto, las proteínas pueden ser localizadas en diferentes compartimentos de la célula hospedera (periplasma, pared celular, medio de cultivo) a través de péptidos específicos fusionados a la proteína. Además, un método más confiable y reproducible para obtener la proteína nativa podría ser llevando a cabo un corte de la proteína de fusión *in vitro*.

La fusión de péptidos ha sido usada en un número considerable de casos siguiendo experimentos similares a los realizados con somatostatina, por ejemplo, en la síntesis de insulina humana (Yansura, 1979); timosina (Wetzel, 1980) y neo-endorfina (Tanaka, 1982). En todos estos casos el péptido deseado fue obtenido del péptido fusión mediante un corte con bromuro de cianógeno. Este procedimiento, sin embargo, no es el único método que ha sido usado para el corte de fusión de péptidos. La  $\beta$ -endorfina fue sintetizada como una proteína de fusión a  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli*. En este caso, debido a la presencia de residuos de metionina internos en  $\beta$ -endorfina, la hormona nativa fue preparada por citraconilación y tratamiento con tripsina.

No todas las fusiones de genes son basadas en el operon *lac*. Por ejemplo, los genes de fusión también han sido construidos usando el gene  $\beta$ -lactamasa. Aunque la expresión de este promotor no es particularmente eficiente, su uso es de interés debido a que  $\beta$ -lactamasa es una proteína de secreción, que confiere resistencia a ampicilina y porta una secuencia señal, la cual tiene una afinidad por la membrana celular y es responsable de exportar a las proteínas que la lleven (Villa-Komaroff *et al*, 1978).

Otra estrategia de fusión simple es la de expresar un producto génico fusionado a sí mismo. Este fue el caso de la proinsulina, la cual se encontró que era más estable en *E. coli* por medio de este sistema de expresión. Similarmente, la producción del IGF-I expresado intracelularmente en *E. coli* fue incrementado 200 veces más, así como su vida media de 2 min a 60 min. En ambos casos, el efecto fue causado probablemente por cambios en el doblaje de la proteína resultado en la formación de cuerpos de inclusión (Goeddel, 1990).

Las dos estrategias de fusión más comunes son las fusiones C-terminal y N-terminal, en donde el gen en el que se va a llevar a cabo la fusión, codifica una proteína que funcionará como sustrato para posteriormente facilitar la purificación de la proteína. Una ventaja con la fusión C-terminal, es que el gen recombinante se localiza en el lado C-terminal de la fusión, es decir, que el promotor y las señales de iniciación de la traducción están todas integradas en la terminación 5' del gen. La fusión N-terminal tiene la desventaja de que el comienzo transcripcional y traduccional de un producto específico estaría dirigido hacia la terminación 5' del gen recombinante, de manera que cuando los métodos químicos son usados para liberar el producto génico generalmente se lleva a cabo un corte en la terminación carboxilo, obteniéndose una proteína no nativa. La ventaja de la fusión N-terminal se debe a la facilidad con la cual se secuencia directamente el producto del gene de fusión y la posibilidad de diseñar varios ensayos de expresión.

Una consideración importante para la expresión de las fusiones de genes es, si los productos podrían ser producidos en forma soluble o insoluble (cuerpos de inclusión). Los cuerpos de inclusión son partículas densas que contienen proteínas precipitadas formadas por la sobreexpresión de las proteínas recombinantes. La formación de los precipitados depende de la solubilidad de la proteína de fusión, de la tasa de síntesis de la proteína y de las condiciones de crecimiento. La estrategia de los cuerpos de inclusión tiene la ventaja de que la proteína en la mayoría de los casos, llega a ser protegida de la proteólisis. Además se obtienen grandes cantidades del producto génico y los cuerpos de inclusión pueden facilitar la recuperación por centrifugación diferencial de las células lisadas. Sin embargo, el producto se recupera en forma inactiva, pero debe ser disuelto y renaturalizado para obtener la proteína biológicamente activa. Un gran número de proteínas recombinantes producidas como proteínas de fusión en *E. coli* se obtuvieron como cuerpos de inclusión o agregados, por ejemplo: somatostatina, insulina A y B, calcitocina, mioglobina, hormona de crecimiento humano y angiotensina. Una estrategia de expresión alternativa es producir la proteína de fusión en forma soluble. Esto tiene la gran ventaja de que se obtiene directamente un producto con actividad biológica sin una renaturalización. Sin embargo, la proteína recombinante soluble podría no ser proteolíticamente estable en el hospedero. El éxito de la estrategia es por lo tanto más difícil de predecir comparado con los cuerpos de inclusión.

Otra consideración importante para la expresión de fusión de genes es además un sistema de secreción que podría ser usado para dirigir el producto a un compartimento específico de la célula. Tales sistemas podrían ofrecer ventajas sobre sistemas de expresión intracelular. En particular, la formación de uniones disulfuro originadas en un ambiente oxidativo exterior al citoplasma. Varias proteínas eucarióticas plegadas correctamente contienen puentes disulfuro que han sido producidos, como se demostró para el factor



de crecimiento epidérmico humano. La secreción de proteínas a el periplasma puede también proteger a las proteínas de la degradación. Ya que el periplasma de *E. coli* contiene aproximadamente el 4% de las proteínas celulares, es obvio que un alto grado de purificación puede obtenerse por secreción del producto génico recombinante. Sin embargo, muchas proteínas no son competentes con la secreción ya que ellas no pueden ser traslocadas a través de la membrana. Sistemas de secreción temprana han dado bajas tazas de producción. Como una comparación, las proteínas producidas intracelularmente que involucran cuerpos de inclusión frecuentemente dan una producción superior al 10% de la proteína total (Goeddel, 1990).

### 3.3 FUSIONES AL GEN $\beta$ -GALACTOSIDASA

La mayoría de las fusiones de genes hechas para la expresión de DNA foráneo en *E. coli* estan basadas en el operón *lac*, usando la secuencia amino terminal del gen  $\beta$ -galactosidasa para formar el péptido fusión.

El operón *lac* de *E. coli* es un operón inducible. Contiene tres genes estructurales: *z* codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, *y* codifica para una permeasa y *a* que codifica para una transacetilasa. Además contiene un promotor (P) y un operador (O) regiones adyacentes al gene *lac z*. El gene regulador (*i*) esta contiguo al operón.

La inducción de los tres genes estructurales del operón de lactosa ocurre durante el inicio de la transcripción. Sin el inductor, la transcripción de los genes ocurre sólo en un nivel muy bajo. El producto del gen regulador (*i*), también llamado represor *lac* tiene una fuerte afinidad por la secuencia de DNA llamada operador (O). Esta secuencia se sobrelapa con la del promotor (P) de manera que en la presencia del represor unido al operador físicamente previene que la RNA polimerasa se una al promotor e

inicie la transcripción. El represor también tiene una fuerte afinidad por moléculas inductoras del operón de lactosa, de manera que cuando hay altas concentraciones de inductor, como el IPTG (isopropiltiogalactosido) un inductor gratuito, éste se une al represor formando un complejo inductor-represor que presenta una afinidad muy baja por la secuencia del operador. El resultado es que el represor no se puede mantener unido al operador, de manera que la RNA polimerasa a su turno, puede comenzar la transcripción del promotor.

Una de las reacciones importantes fisiológicamente que es catalizada por  $\beta$ -galactosidasa es el corte de lactosa para producir dos monosacáridos: glucosa y galactosa. Actualmente esta actividad enzimática puede ser cuantificada debido al uso de un sustrato sintético llamado Xgal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosido) que al ser hidrolizado por  $\beta$ -galactosidasa da como producto galactosa más un compuesto que da una coloración azul.

Es por todo esto que el sistema  $\beta$ -galactosidasa ha sido extensamente utilizado en fusiones de genes, no sólo para la expresión sino también como una prueba de la actividad transcripcional y traduccional. El gen estructural *lacZ* puede ser fusionado al promotor y a elementos control de otros genes como una forma de proporcionar un marcador enzimático para la expresión del gen. Las fusiones de genes pueden ser construídas ya sea *in vivo* usando recombinación no homóloga espontánea o recombinación de transposones semi-específicos de sitio, o *in vitro*, con tecnología de DNA recombinante. Las fusiones del gen  $\beta$ -galactosidasa pueden ser construídas con señales control de inicio de la transcripción. Esto se hace removiendo la región del promotor del gen  $\beta$ -galactosidasa o el promotor y las regiones de iniciación de la traducción. En una fusión de genes esta parte inicial del gen  $\beta$ -galactosidasa puede ser reemplazada por el promotor, el sitio de iniciación de la traducción y aparentemente algún número de codones del amino terminal de otro gen. La expresión de  $\beta$ -galactosidasa de una fusión de genes puede usarse no sólo para medir la expresión de

un gen y su regulación, sino también para mutaciones y para fusiones de genes adicionales.

Otro aspecto importante de la traducción de fusiones de genes a  $\beta$ -galactosidasa es la formación de proteínas híbridas que pueden servir para el estudio de las mismas. La proteína híbrida puede ser identificada por la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa y una vez purificada por estudios de las funciones de la proteína localizada en el extremo amino.

El principio del sistema de expresión, consiste en un vector que contiene el gen estructural  $\beta$ -galactosidasa sin su región de iniciación, usándose para clonar un fragmento de DNA que contiene una región de iniciación de la transcripción y traducción de genes y codones amino terminal para formar la fusión del gen. Alternativamente, las fusiones pueden ser hechas insertando un fragmento de DNA que contenga el gen estructural  $\beta$ -galactosidasa a un vector que contenga previamente el gen de interés. Para una fusión funcional, los segmentos del gen deben estar alineados en su dirección de transcripción y, para una fusión traduccional, sus codones de aminoácidos deben estar en fase.

También es importante considerar que algunas proteínas híbridas son letales para la célula cuando se sintetizan en un alto nivel, como se sabe para algunas fusiones de proteínas unidas o transportadas a membrana.

Las fusiones de  $\beta$ -galactosidasa pueden ser usadas en muchas especies para las cuales la transformación de DNA sea posible, tal como una bacteria gram-positiva, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces* y en eucariontes superiores tales como plantas y células en cultivo de tejido de mamífero (Grossman et al, 1983).

#### 4. EL SISTEMA DE FUSION CON MBP

Las fusiones de genes han sido usadas exitosamente para facilitar la expresión y purificación de péptidos codificados en moléculas de DNA recombinante. Una alternativa semejante ha sido la de fusionar la proteína de interés a la 'maltose-binding protein' (MBP) codificada por el gen *malE* de *E. coli*.

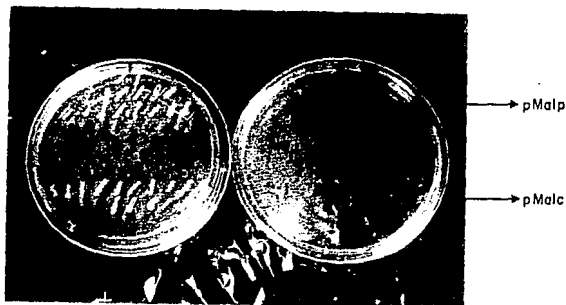
Algunas de las ventajas de usar fusiones a MBP para expresar y purificar péptidos foráneos son: a) las proteínas híbridas pueden ser aisladas en un sólo paso de cromatografía. La MBP se une con alta afinidad a una matriz de amilosa, y es liberada de la matriz con maltosa; b) los materiales para la cromatografía de afinidad son económicos y fáciles de preparar, haciendo una purificación simple y factible a gran escala; c) a diferencia de las resinas de afinidad por anticuerpos, la purificación completa tiene lugar bajo condiciones fisiológicas y la desnaturalización de la proteína después de la elusión de la matriz de afinidad no debería ocurrir; d) la proteína fusionada puede potencialmente ser dirigida hacia diferentes compartimentos celulares variando la secuencia guía de la MBP y, finalmente la MBP no contiene ningún residuo de cisteína que pudiera interferir con la formación de uniones disulfuro dentro del péptido deseado (Guan et al, 1988).

##### 4.1 ESTRATEGIA DE FUSION CON MBP

Existe una amplia variedad de vectores que pueden ser usados para llevar a cabo este tipo de fusión, entre ellos están los plásmidos pMal-p y pMal-c, los cuales contienen una porción del gen *malE* fusionada a una secuencia que codifica para el fragmento  $\alpha$  del gen *lacZ*, correspondiente al extremo amino de la proteína  $\beta$ -galactosidasa.

Existen algunos vectores, como los arriba mencionados, que contienen una secuencia de DNA que codifica el fragmento  $\alpha$  de  $\beta$ -galactosidasa; similarmente algunas bacterias sólo portan el gen *lac Z* deletado en la terminación 5' y el producto es denominado el fragmento omega ( $w$ ). De manera que cuando un plásmido que porta el fragmento  $\alpha$  es introducido en una bacteria que contiene el fragmento  $w$  se dice que se lleva a cabo la alfa complementación debido a que los fragmentos  $\alpha$  y  $w$  forman un complejo que tiene la actividad enzimática propia de  $\beta$ -galactosidasa. De manera que al realizar la inserción de la secuencia clonada en el sitio de policlonación de pMal-p o pMal-c, el cual esta localizado entre *malE* y *lacZ $\alpha$* , se evita la  $\alpha$ -complementación. Este fenómeno es detectado cuando a las bacterias se les proporciona como sustrato de  $\beta$ -galactosidasa el Xgal, el cual en condiciones normales, es decir, cuando el gene *lacZ* esta completo, da a las colonias una coloración azul que evidencia la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa, pero, si la alfa complementación es interrumpida, no habra enzima suficiente que hidrolice al compuesto Xgal y las colonias serán blancas. De esta forma, en las cajas que contengan el sustrato Xgal y el inductor IPTG (inductor gratuito de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa) las colonias crecerán azules mientras que las colonias de bacterias recombinantes serán blancas. Fig. 6.

El método usa el promotor fuerte 'tac' y las señales de inicio de traducción de *malE* para dar altos niveles de expresión de la secuencia clonada. Los vectores llevan el gen *lacI*, el cual codifica para el represor Lac y éste mantiene baja la expresión del promotor 'tac' en ausencia de la inducción por IPTG. La región *malE* del pMal-c carece de una secuencia señal y es designado para producir proteínas híbridas en el citoplasma. El pMal-p contienen la secuencia señal normal de *malE*, y potencialmente permite la exportación de la proteína híbrida en el periplasma. Las proteínas de fusión expresadas en pMal-c constituyen del 20-40% de la proteína celular total, mientras que la proteína expresada en pMal-p constituye del 5-10% de la proteína celular total. En ambos casos



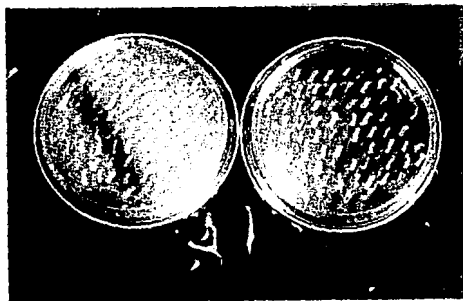
Sin inductor

Con inductor  
(IPTG 100 mM)

Figura 5. Colonias transformadas con los vectores pMalp y pMalc.

En las cajas con inductor se ve claramente la expresión del gene LacZ. Debido a la  $\alpha$ -complementación se observa la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual rompe al sustrato X gal en glucosa y 5-Bromo-4-cloro-3-indolil dando una coloración azul a las colonias.

Las colonias sin inductor son blancas porque el gene LacZ se encuentra reprimido y no se puede llevar a cabo la  $\alpha$ -complementación.



Sin inductor

Con inductor  
(IPTG 100 mM)

Figura 6. Colonias transformantes obtenidas de la ligación del plásmido pMalc con el fragmento del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico que va de la 2.a. asa citoplásmica al extremo carboxilo.

Las colonias que contenían el vector con el inserto fueron de color blanco aún con el inductor debido a que sufrieron una inserción en el gene LacZ y no hubo  $\alpha$ -complementación.

Las colonias azules no llevan inserto alguno observándose el mismo fenómeno de  $\alpha$ -complementación como en los vectores pMalp y pMalc con inductor.

una banda correspondiente a la proteína híbrida puede ser vista generalmente corriendo una pequeña muestra en un gel de SDS-PAGE. Los vectores pMal también contienen la secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de la proteasa específica factor Xa, localizada justo en la terminación 5' a los sitios de inserción del polylinker. Esto permite a la MBP ser cortada de la proteína de interés después de la purificación. Fig. 3

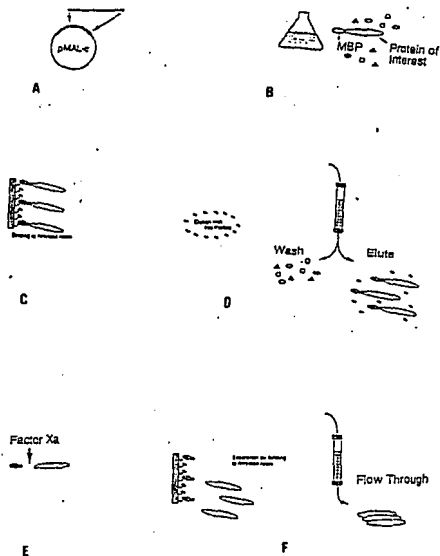
#### 4.2 PURIFICACION DE LA PROTEINA DE FUSION

Una vez obtenido el gen recombinante, éste es sobre-expresado en la cepa de *E. coli* más adecuada. El extracto celular crudo es pasado sobre una columna de resina de amilosa de 3cm x 6 cm. La proteína de fusión se une a la resina en virtud de la afinidad a amilosa de la MBP mientras que el resto de las proteínas son lavadas a través de la columna. Después la fusión es suavemente eluida con un buffer neutro que contenga 10 mM de maltosa.

Una vez que se obtiene la fracción eluida de la proteína de fusión, es tratada con la proteasa factor Xa, que cortará específicamente el sitio que libera a la proteína blanco del dominio de la MBP. Los dos dominios ahora cortados podrán ser separados pasándolos a través de una columna fresca de amilosa. El dominio de la MBP se unirá a la resina, y permitirá que la proteína de interés fluya a través de la columna.

La producción de una proteína de fusión de una purificación por afinidad es de aproximadamente 100 mg/l de cultivo, con una producción típica en el rango de 10-40 mg. La producción varía enormemente dependiendo de la secuencia fusionada a malE. En casos en donde la producción ha sido comparada directamente, pMal-c da de 8 a 15 veces más proteína en la purificación por afinidad que el pMal-p. El pMal-p es útil para casos en donde se desea exportar al periplasma, para purificación o formación de uniones disulfuro.





**Figura 3. SISTEMA DE PURIFICACION Y PROTEINA DE FUSION A MBP**

A.El gen de interés es clonado en uno de los vectores pMAL, creando un gen de fusión con el gen malE que codifica para la MBP. B.Las transformantes de *E. coli* son crecidas en cultivo, el cual es inducido para producir la proteína de fusión MBP. C.El extracto crudo de células es purificado a través de una columna de amilosa. La proteína de fusión se une a la columna de amilosa, mientras que las otras proteínas fluyen a través. D.La proteína de fusión pura es entonces eluida de la columna usando un buffer que contiene maltosa. E.La proteína de fusión purificada es cortada con la proteasa específica Factor Xa. F.La proteína de interés es separada de la MBP pasando la mezcla en una columna de amilosa. La MBP se une a la columna mientras que la proteína clonada fluye a través.

Hasta ahora, aproximadamente el 75% de las fusiones hechas se obtuvieron mediante purificación por afinidad. En casos en donde la fusión se une a la columna pobremente o casi nada, es que se degradó por proteasas de *E. coli* o es insoluble.

## OBJETIVOS

- 1) Construir fusiones genéticas con la proteína MBP y el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico que puedan ser expresadas en *Escherichia coli*.
- 2) Expresar el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico en *E. coli* con el fin de obtener cantidades suficientes de proteína para la producción de anticuerpos.
- 3) Obtener anticuerpos policlonales capaces de inmunoprecipitar al receptor lo que nos permitirá profundizar en la caracterización fisiológica del receptor  $\alpha_{1B}$  de rata.

## MATERIALES Y METODOS

### 1) Mapa de restricción del receptor $\alpha_{1B}$ adrenérgico.

El cDNA del receptor alfa 1 adrenérgico de hamster fue proporcionado por el Dr. Robert Lefkowitz del Departamento de Medicina de la División Cardiovascular de la Universidad Duke Medical Center. El segmento de cDNA consta de aproximadamente 2 Kb y nos fue enviado en el plásmido SP65 en el sitio Eco RI (orientación 5' - 3'). Fig. 4.

Se utilizaron las endonucleasas: Bam HI, Eco RI, Pst I, Pvu II y Sma I, todas provienen de New England Biolabs, Inc. Se preparó la mezcla de reacción con un volumen total de 50  $\mu$ l: 0.2-5  $\mu$ g del DNA a digerir, 5  $\mu$ l de buffer 10X, 44  $\mu$ l de agua y 1  $\mu$ l de la enzima de restricción de 10 000 unidades/ml. La mezcla se incubó a 37°C por 1 hora.

Una vez digerido el DNA se corrieron en un gel de agarosa (Standard Low de BIO-RAD) al 1%, alícuotas de 5  $\mu$ l de cada una de las digestiones, así como también una muestra del plásmido sin digerir y el marcador de peso molecular, DNA de Lambda digerido con Bst EII, para poder comparar y así construir el mapa de restricción.

### 2) Electroforesis de ácidos nucleicos.

Se prepararon geles de agarosa al 1% con buffer de corrida TBE 1X (Tris-HCl 0.045 M, ácido bórico 0.045 M, EDTA 0.001 M), una vez calentada la mezcla, se vació en una cámara horizontal, donde se dejó gelificar, después se sumergió completamente en buffer TBE 1X. Las muestras de DNA se prepararon mezclándolas con un volumen igual de azul de bromofenol 0.25 % - glicerol 50 %, después se cargaron cuidadosamente en cada uno de los pozos del gel usando una micropipeta. Se cerró la tapa de la cámara y se conectó a una fuente de poder (Electrophoresis Power Supply EPS 500/400) aplicando una corriente de 100 V. Una vez corrida la

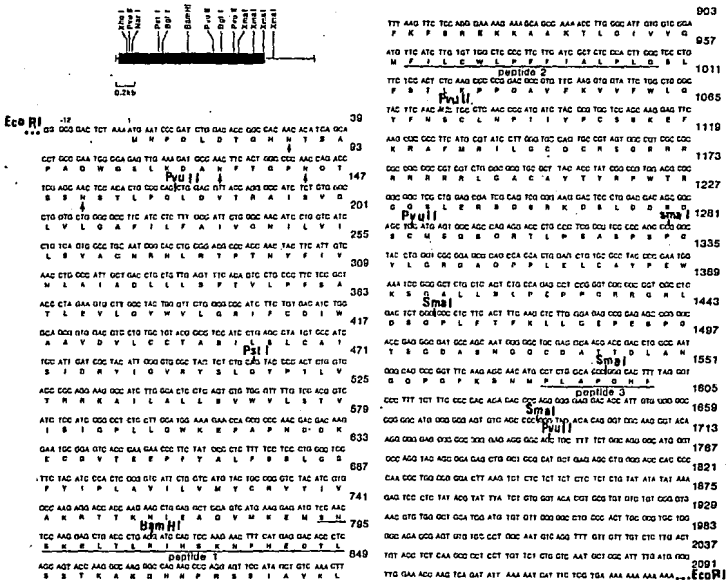


Figura 4. Mapa de restricción, secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del cDNA del receptor  $\alpha_2$  adrenérgico de hamster.

electroforesis, el gel de agarosa se sumergió en una solución diluida 0.5 µg/ml de bromuro de etidio para teñir el DNA y poderlo observar por medio de un transiluminador de luz ultravioleta FesherBiotech FBTIV-614.

También se preparaban geles de poliacrilamida al 7.5% para DNA; estos geles se utilizaban principalmente cuando se deseaba visualizar fragmentos de DNA de tamaño pequeño, por ejemplo los insertos que se obtenían del cDNA del alfa 1 B adrenérgico para llevar a cabo la construcción de las fusiones.

### 3) Purificación de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Maniatis, 1989).

El cultivo de bacterias con el plásmido se centrifugó a 5000 g durante 5 min. (rotor GSA, centrifuga Sorvall). La pastilla celular se resuspendió en 3 ml de una solución de glucosa mix (EDTA 10 mM, Trizma 25 mM, Glucosa 50 mM); RNA'sa al 2.5 % y Lisozima al 0.2 %. Se incubó en hielo por 30 min. Después de este tiempo se añadieron 3 ml de una solución de NaOH 0.2 N y SDS 1% y se colocó en hielo por 3 min. Luego se agregaron 2.5 ml de acetato de sodio 3 M, pH 5.5 y se agitó muy suavemente, después se mantuvo en hielo por 15 min. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se le agregó un volumen igual de fenol saturado agua, se agitó en el vortex y se centrifugó 5 min a 10 000 rpm. La fase acuosa fue tomada con mucho cuidado y pasada a un tubo limpio para agregarle tres volúmenes de etanol absoluto (de Baker) y una décima parte del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.5. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó a 10 000 g por 15 min. La pastilla recuperada fue decantada y secada al vacío por 20 min, para después resuspenderse en un volumen mínimo (50 µl) de agua bidestilada estéril.

#### 4) Electroelución.

Se cortaron las bandas deseadas, visualizándolas iluminando el gel de poliacrilamida con luz ultravioleta de onda larga. Los fragmentos de acrilamida se colocaron en bolsas de diálisis y se adicionaron 250  $\mu$ l de buffer TBE 0.1X. Las bolsitas fueron colocadas en una cámara para minigeles y llenada con buffer TBE 0.1X lo suficiente para cubrir las bolsitas. Estas fueron colocadas perpendicularmente a la línea entre los electrodos y se aplicó una corriente de 100 V. durante 1 hora. Después se invirtió la polaridad y se corrió durante 1 min más para despegar el DNA de la pared de la bolsa. Se tomó, cuidadosamente, la solución de las bolsitas y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se midió el volumen del eppendorf y se llevo a un volumen de 400  $\mu$ l. Después se añadió un volumen igual de butanol saturado con NaCl 3 M, se agitó en el vortex y se centrifugó a 12 000 rpm por 3 min en la microcentrifuga (Biofuge A de American Scientific Products). Se descartó la fase superior y a la fase acuosa se le añadió un volumen igual de fenol/cloroformo 1:1, se agitó en el vortex y se centrifugó a 12 000 g por 3 min en la microcentrifuga. Posteriormente se tomó la fase acuosa, se pasó a un tubo limpio y se le añadió 1 ml de etanol al 100 % y 30  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, pH 5.5, se dejó a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Luego se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min y se recuperó la pastilla, la cual se secó al vacío durante 20 min. Finalmente se resuspendió en un volumen mínimo de agua bidestilada estéril (50  $\mu$ l).

#### 5) Ligación.

Las ligaciones que se llevaron a cabo fueron tanto de extremos cohesivos como de extremos rasurados. Los plásmidos a los cuales se ligó el inserto de DNA fueron: pMalp y pMalc de New England BioLabs, Inc. El volumen de la mezcla de reacción fue de 20  $\mu$ l: 1  $\mu$ l de DNA Ligasa de T4 de 20 000 unidades/ml de New England BioLabs, Inc. y 2  $\mu$ l de buffer 10X, mientras que las cantidades de

inserto a ligar y de vector linearizado dependieron de la concentración en que era obtenido dicho DNA y de la relación que debían guardar uno con respecto al otro dependiendo de su tamaño. Manteniendo una relación molar de 1:1. La mezcla de reacción se incubó 1 hora a 16°C.

#### 6) Transformación de Bacterias.

Las cepas transformadas fueron: HB101, TBl, MGT7, TG1, NH522, Y1089 y Y1090 todas derivadas de *Escherichia coli*. (Tabla 1).

Se creció el cultivo celular a una densidad óptica de 0.6 a 660 nm de longitud de onda. Se colocó en hielo por 10 min y después se centrifugó a 5 000 rpm (rotor GSA, centrífuga Sorvall) para cosechar las bacterias. La pastilla fue resuspendida en la mitad del volumen inicial en CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se incubó durante 45 min. Se centrifugó nuevamente a 5 000 rpm por 5 min, se recuperó la pastilla y se resuspendió en una décima parte del volumen inicial en CaCl<sub>2</sub>. Posteriormente se tomaron alícuotas de 200 µl de células competentes y se les añadió 10 µl de la ligación (plásmido con el inserto correspondiente) previamente realizada. Se incubaron en hielo durante 1 hora. Después las bacterias fueron sometidas a un shock térmico colocándolas a 42°C por 90 seg. Luego fueron recuperadas con 1 ml de LB (Luria-Bertani) e incubadas a 37°C por 1 hora. Finalmente fueron sembradas en cajas con medio selectivo e incubadas a 37°C toda la noche.

#### 7) Selección de las Transformantes.

Las colonias obtenidas de la transformación fueron sembradas en forma de parches en cajas con medio mínimo en los siguientes lotes: a) cajas sin inductor y sin sustrato: estreptomycinina 10 µg/ml, prolina al 1% y ampicilina 20 µg/ml; b) cajas sin inductor y con sustrato: estreptomycinina, prolina, ampicilina y Xgal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) de SIGMA; c) cajas



**TABLA 1**

CEPA	GENOTIPO
TB1	ara Δ(lac proAB) rpsL (φ80 lacZΔM15) hsdR
HB101	supE44hsdS20(r <sup>am</sup> s <sup>r</sup> )recA13ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20xyl-5 mtl-1
TG1	supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB)
Y1089	araD139 Δ(lacU169) hflA150[chr::Tn10(tet <sup>r</sup> )] pMC9 proA <sup>+</sup> Δ(lon)
Y1090	subF araD 139 str A pro A <sup>+</sup> Δ(lon) Δ lacU169(trpC22::Tn)pMC19
MGT7	
NH522	

con inductor y con sustrato: estreptomicina, prolina, ampicilina, Xgal e IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) de SIGMA. Las colonias que contenían el vector con el inserto ligado correctamente fueron de color blanco aún en el lote c, mientras que las colonias que realmente no habían recibido el inserto dieron una coloración azul, esto se debió a que en estas últimas se pudo llevar a cabo la  $\alpha$ -complementación, mientras que las colonias con el inserto sufrieron una interrupción en el gen *Lac Z*, y no hubo  $\alpha$ -complementación. Figs. 5 y 6.

#### 8) Inducción de la proteína de fusión.

El cultivo de bacterias transformadas se creció a una densidad óptica de 0.6 a 660 nm de longitud de onda. Se tomó una muestra de 1 ml del cultivo y se centrifugó a 10 000 rpm por 1 min en la microcentrifuga. El botón fue resuspendido en 50  $\mu$ l de solución Laemly 2X y se consideró como la muestra sin inducir. Después se añadió 300  $\mu$ l de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) 0.1 M por cada 100 ml de cultivo y se dejó incubando a 37°C por 2 horas. Posteriormente se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a 10 000 rpm por 1 min en la microcentrifuga, la pastilla se resuspendió en 50  $\mu$ l de solución Laemly 2X y se consideró como la muestra inducida. Dichas muestras fueron corridas en un gel desnaturante de proteínas.

#### 9) Electroforesis de proteínas.

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS al 10 % con las siguientes sustancias: 24 ml de agua, 15 ml de Tris 1.5 M, pH 8.8, 20 ml de acrilamida al 30 %, 600  $\mu$ l de SDS al 10 %, 300  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10 % y 30  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'-Tetra-metiletilenadiazina), toda la mezcla fue desgasificada por 5 min. Después se preparó el gel concentrador al 5 %: 14.3 ml de agua, 6.3 ml de Tris 0.5 M, pH 6.8, 4.2 ml de acrilamida al 30%, 250  $\mu$ l de SDS al 10 %, 150  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10 % y 15  $\mu$ l de

TEMED, toda la mezcla desgasificada por 5 min. Una vez gelificados los geles se cargaron las muestras en cada uno de los pozos, así como los marcadores de peso molecular de bajo rango de BIO-RAD. El gel fue colocado en la cámara de electroforesis y sumergido en el buffer de corrida (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1 %). Se le aplicó una corriente de 15 mA y se dejó corriendo durante toda la noche.

#### 10) Western-blott.

Se humedeció previamente tanto el gel como el filtro de nitrocelulosa en el buffer de transferencia frío (Tris 15.6 mM, Glicina 120 mM y Metanol al 25 %). Se colocaron cuidadosamente y en el siguiente orden: la rejilla, la esponja, el gel, sobre él el filtro de nitrocelulosa, cuidando de no dejar ninguna burbuja entre ambos, la esponja y la rejilla; una vez formado el sandwich, se colocó en el aparato de transferencia y se bañó con el buffer frío. Se transfirió durante 2 horas a 60 V. Posteriormente el filtro de nitrocelulosa con las proteínas adheridas fue bloqueado en una solución de albúmina al 3 % por 2 horas. Después se le hicieron 4 lavados con PBS-tween (fosfato de sodio 0.015 M, NaCl 0.018 M y tween 20 al 0.2%) de 5 min cada uno. Se incubó con el primer anticuerpo, anti-MBP (Maltose Binding Protein) en una dilución 1:10 000 en PBS-tween, durante toda la noche. Al día siguiente se le hicieron los lavados al filtro de nitrocelulosa para colocar el segundo anticuerpo, anti-Rabbit IgG de BIO-RAD, en una dilución 1:1 000 en PBS-tween, se incubó durante 6 horas. Nuevamente el filtro fue lavado con tres cambios y después fue sumergido en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M y MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 9.8 para poder ser revelado con el sustrato BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) y con el reactivo de color NBT (azul de nitrotetrazolio).

#### 11) Columna de Afinidad.

El cultivo de bacterias se creció a una densidad óptica de 0.2 a 600 nm de longitud de onda. En este punto, las células se indujeron con IPTG a una concentración final de 1 mM durante 4 hrs. a 30°C. Después las células fueron centrifugadas a 5 000 rpm 5 min. y la pastilla fue resuspendida en buffer de lisis ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, NaCl 30 mM, tween 20 al 0.25%,  $\beta$ -mercapto 10 mM, EDTA 10 mM y EGTA 10 mM). Esta solución se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se descongeló en agua fría. Luego las bacterias en solución fueron sonicadas durante 2 min. con intervalos de 30 seg. Después se les agregó NaCl a una concentración final de 0.5 M. Las bacterias se centrifugaron a 9 000 rpm durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se diluyó 1:5 con buffer de columna más tween. A esta mezcla se le añadió el volumen adecuado de resina de amilosa y se dejó agitando toda la noche.

Al día siguiente el recipiente que contenía la resina con el sobrenadante se dejó reposar y después de un rato fue decantado. Luego la resina de amilosa se cargó en una columna de 50 ml y se realizaron los siguientes lavados: 1° lavado 3 volúmenes de columna con buffer de columna + tween 20, 2° lavado 5 volúmenes de columna con buffer de columna sin tween y, 3° lavado con buffer columna + maltosa 10 mM. Durante este 3° lavado se recolectaron fracciones de 3 ml. cada una y se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm para detectar la presencia de la proteína de fusión que debería de eluir en este momento.

Una vez detectado el pico de mayor absorbancia, las fracciones colectadas que contenían la proteína fueron juntadas en un solo volumen para dializarse contra un buffer de Tris-HCl 10 mM durante toda la noche. Al día siguiente, la proteína fue concentrada en amicon y se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry (Lowry et al, 1951).

## RESULTADOS

### I Construcción de diferentes fusiones MBP-receptor $\alpha_{1B}$

La construcción de las diferentes fusiones se hicieron a partir del cDNA del receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico de hamster, que consta de aproximadamente 2 Kb. Es importante aclarar que no fue posible construir una fusión con el cDNA del receptor completo, debido a que no se conocía la secuencia exacta de nucleótidos en donde corta la endonucleasa EcoR I, en el extremo 5' de la secuencia del cDNA del receptor enviada por el Dr. Lefkowitz (ver fig. 4). De tal manera que al realizar la construcción génica no tendríamos la certeza de que el DNA quedara en el marco de lectura correcto para codificar la proteína receptor alfa 1 adrenérgico.

No obstante, ésto no significaba un problema para nuestro objetivo, ya que podíamos construir fusiones con sólo una parte del DNA del receptor, que al ser expresado como proteína, codificara para un epítoto capaz de inmunoprecipitar al receptor de cualquier tejido donde se encontrara.

Otro punto importante es que nuestro interés se concentraba en los segmentos transmembranales del receptor (principalmente los tres últimos) debido a que la especificidad de la unión del ligando al receptor recae en esta parte estructural de la proteína.

Luego entonces, las cuatro fusiones que se realizaron varían en el número de pares de bases y en la región que comprenden del receptor.

#### a) Fusión pCPst.

La primera construcción comprende desde el cuarto segmento transmembranal hasta el extremo carboxilo del receptor y tiene una longitud de 1670 pb. Este segmento de DNA fue ligado al sitio de policlonación del plásmido pMalc, en el sitio Pst I cuidando

que quedara en fase con el gen *malE*, formando así la proteína de fusión MBP- $\alpha_{10}$ . Esta nueva clona se denominó pCPst. Fig. 8a. Para comprobar que la construcción fuera correcta se realizó un mapa de restricción de esta clona Fig. 8b.

b) Fusión pCSma.

La siguiente fusión se construyó a partir de la clona pCPst y únicamente se deletó el extremo carboxilo, quedando un segmento de 822 pb de longitud. De igual forma este inserto fué ligado en los sitios Pst I y Sma I del plásmido pMalc. Dicha clona se denominó pCSma. Fig 9a. Mapa de restricción Fig. 9b.

c) Fusión pP905.

Una fusión más fué construída con los siete segmentos transmembranales del receptor, sin el extremo amino y sin el extremo carboxilo. De la misma forma arriba descrita se construyó la proteína de fusión formando la clona pP905, en este caso el plásmido que se utilizó para la construcción fue el pMalp Fig. 10a. Mapa de restricción Fig. 10b.

d) Fusión pP338.

La clona más pequeña consta de 338 pb y comprende los tres primeros segmentos transmembranales del receptor. Dicha clona también fue construída en el plásmido pMalp y se denominó pP338 Fig. 11a. Mapa de restricción Fig. 11b.

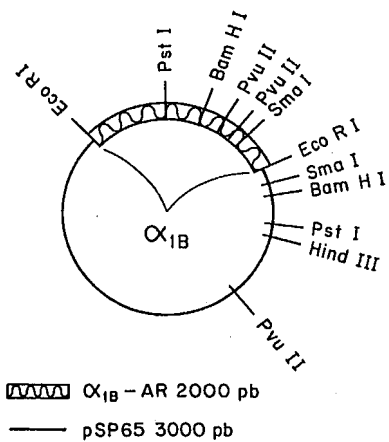
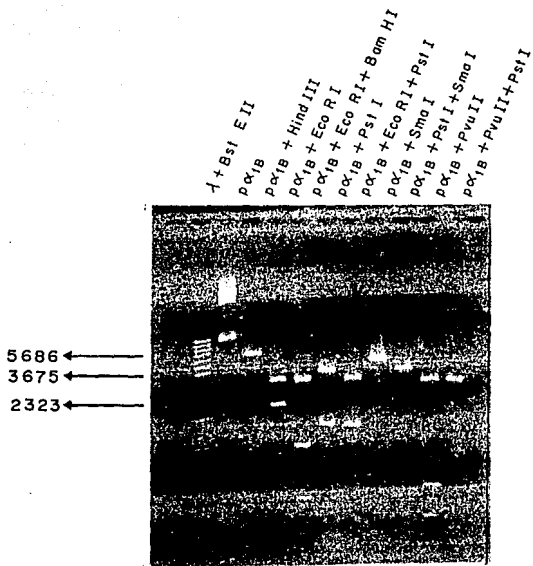


Figura 7a.



Agarosa 1%

Figura 7 b. Mapa de restricción del receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$  (p $\alpha_{1B}$ ) clonado en el plásmido pSP65



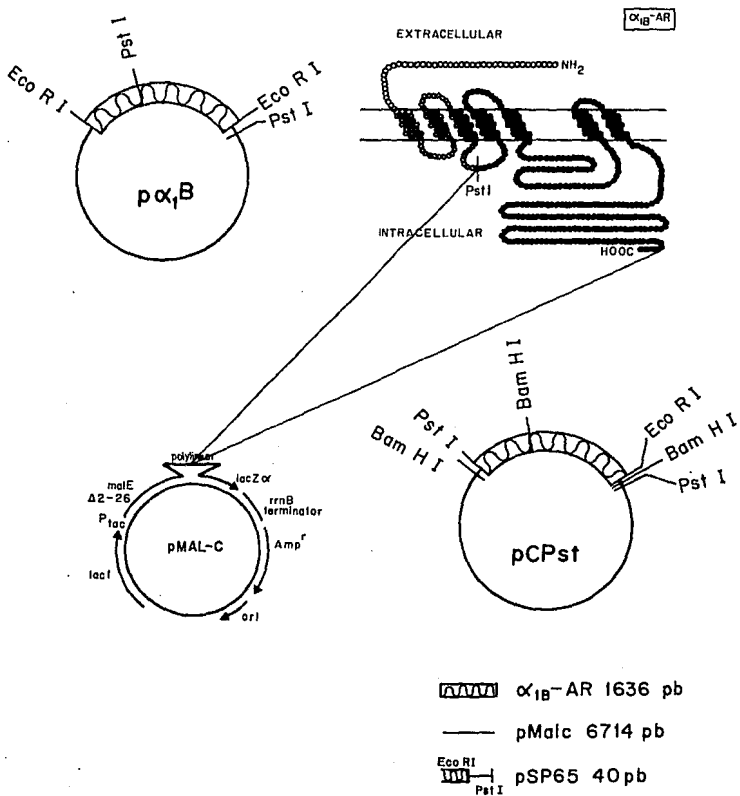


Figura 8a.

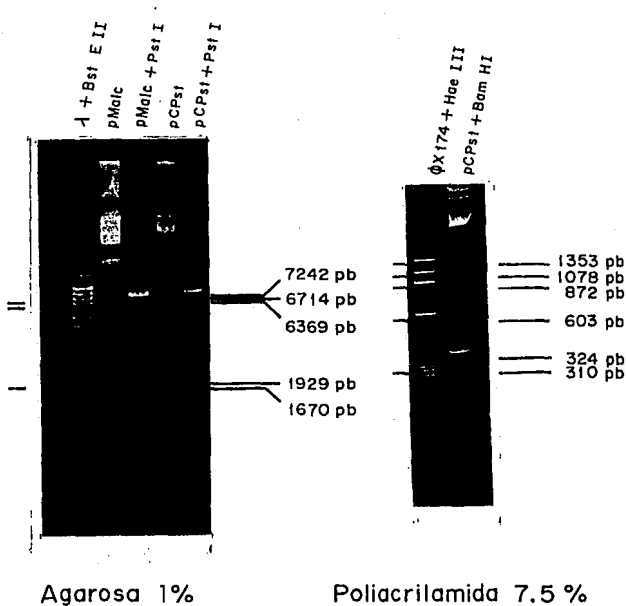


Figura 8 b. Mapa de restricci3n de la clona pCPst

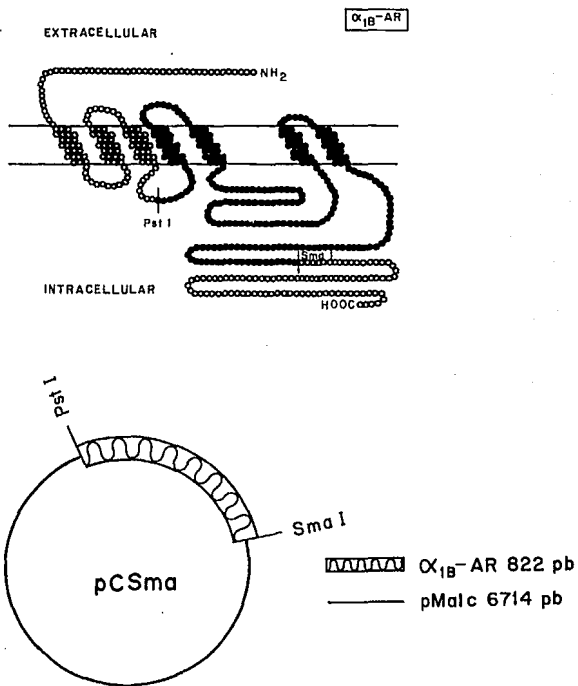
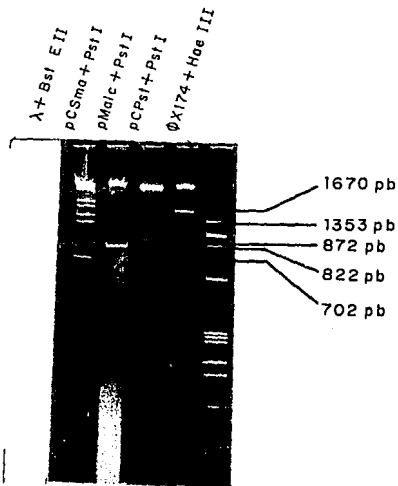


Figura 9a.



Poliacrilamida 7.5 %

Figura 9 b. Mapa de restricción de la clona *pCSma*

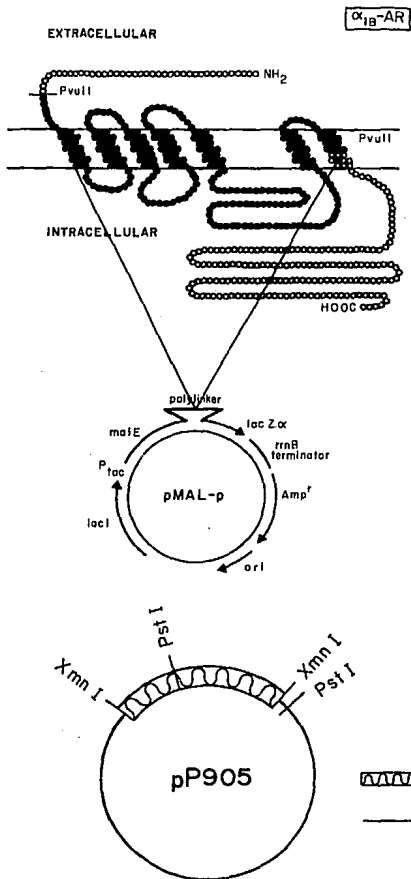


Figura 10 a.

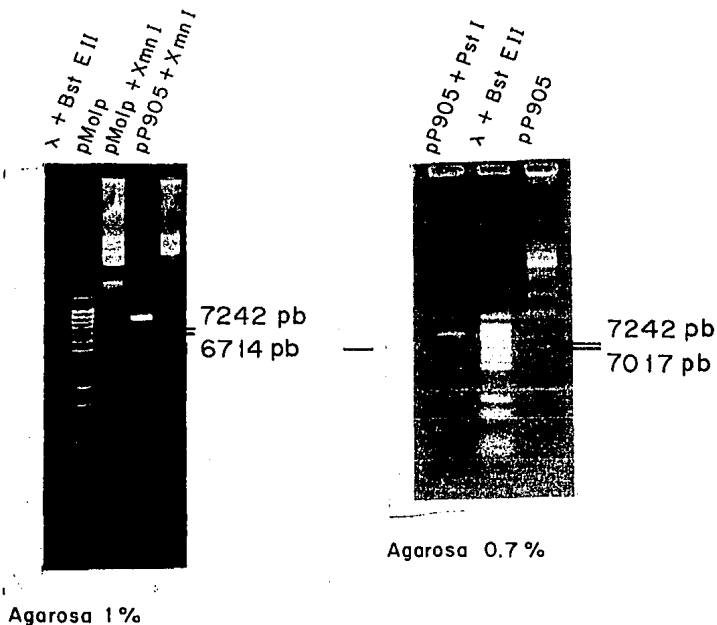


Figura 10 b Mapa de restricción de la clona pP905. En el carril pP905 + Xmn I se observa que la clona pP905 migra más arriba que el pMalp debido a que lleva el inserto del  $\alpha_{1B}$ -AR, además la enzima Xmn I no pudo cortar el plásmido porque el sitio de restricción no se regeneró

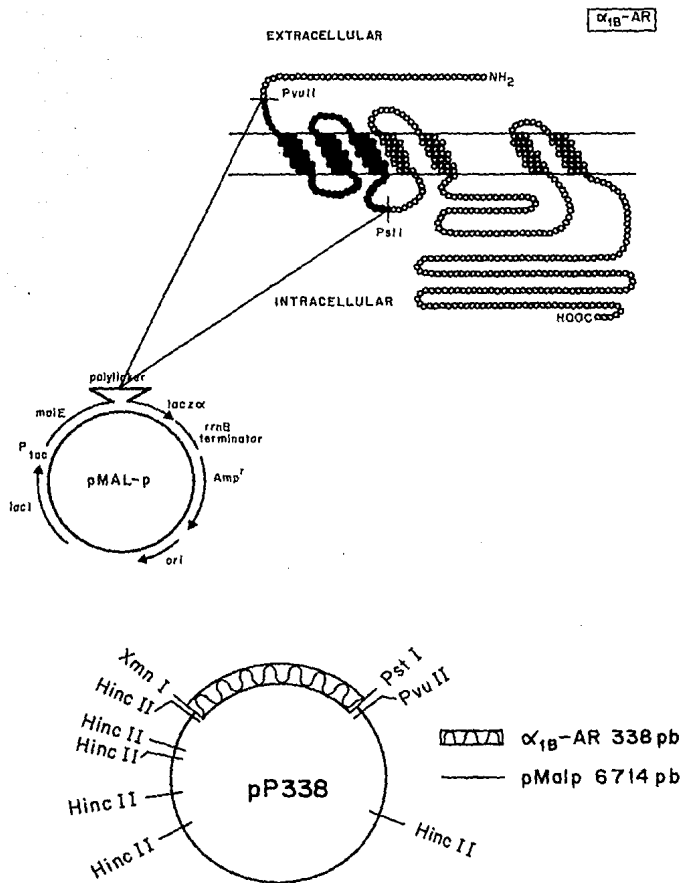


Figura 11 a.

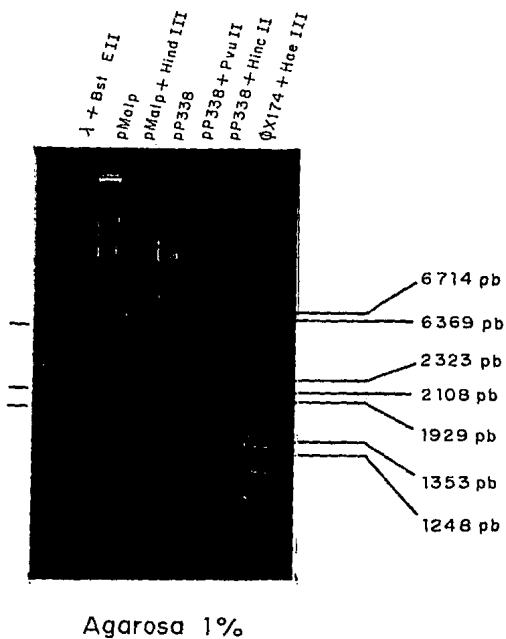


Figura 11b. Mapa de restricción de la clona pP338



## II Expresión de las Proteínas de Fusión

En la segunda etapa de este trabajo, se intentó expresar, las cuatro fusiones construídas, en la cepa TB1 de *Escherichia coli*.

La primera fusión que se probó fue la de pCPst, construída en el plásmido pMalc, el peso molecular calculado para ésta proteína de fusión es de 104 KDa. En la Fig. 12, se muestra un gel de poliacrilamida-SDS al 10% teñido con azul de Coomassie, en el que se observa que no hay una diferencia significativa entre las células sin inducir y las células inducidas con IPTG 1 mM durante 2 hrs, ya que la banda de 104 KDa correspondiente a la proteína de fusión no se detecta entre el conjunto de bandas de las proteínas totales de la bacteria.

En la figura 13a, se muestra un gel de poliacrilamida-SDS al 10%, en el que se trató de observar la expresión de otras dos fusiones, pCSma con un peso molecular de 72 KDa y pP905 de 75 KDa, éstos plásmidos se encontraban en la misma cepa y se indujeron bajo las mismas condiciones. No se observó ninguna diferencia entre las bacterias sin inducir y las bacterias inducidas con IPTG 1 mM, en ninguna de las dos clonas; sólo se pudo observar un ligero incremento en la expresión de una banda de 42 KDa que corresponde al control, bacterias transformadas únicamente con el plásmido pMalp, en las que se muestra la inducción de la proteína MBP.

La figura 13b, inmunoblot con el anticuerpo anti-MBP, muestra datos más interesantes. Aquí podemos ver la respuesta al anticuerpo de un conjunto de bandas con un PM aproximado de 60 KDa que parece ser se trata de unos fragmentos de la proteína de fusión ya que su peso molecular es mayor al de la MBP nativa. También se puede observar la reacción propia de la MBP contra su propio anticuerpo, una banda de 42 KDa.

La fusión pP338 también fue expresada en la cepa TB1, Fig. 14a. Los resultados fueron similares a los arriba descritos, la única banda que se detecta en las bacterias inducidas con IPTG 1 mM, es la que corresponde al control, MBP (42 KDa). De igual forma

en el inmunoblot, Fig. 14b, sólo se observa una banda de 42 KDa, correspondiente a la MBP.

a) Solubilidad de la proteína de fusión.

Tomando en cuenta que los receptores son proteínas de membrana, es muy probable que la proteína de fusión forme agregados debido a la alta hidrofobicidad de la molécula; de tal manera que dichos agregados no logren entrar en el gel y por lo tanto no podamos ver la proteína. Así que se probaron dos métodos para solubilizar los cuerpos de inclusión. En la Fig. 15 se muestran las bacterias inducidas en las mismas condiciones anteriores, pero adicionalmente tratadas con digitonina al 2% (Lomasney, 1986) o dializadas contra una solución de urea 8 M (Nagai, 1987). Sin embargo, no se observó ningún cambio en el patrón de bandas de la clona TB1/pCPst.

b) Inhibir a las proteasas endógenas de la bacteria.

Otra estrategia fue tratar las bacterias inducidas con PMSF 2 mM (Bertin, 1992) un inhibidor de proteasas. Para realizar esta prueba utilizamos la clona TB1/pp905. En la Fig. 16. se muestra un gel de poliacrilamida-SDS en el que se puede observar que no hubo ningún cambio en el patrón de bandas en los distintos tratamientos con PMSF de manera que la banda de 75 KDa, correspondiente a la proteína de fusión, no se observó.

c) Cambio de cepa.

Pensamos que probablemente se trataba de la cepa, quizá no era la más adecuada para la expresión de la proteína de fusión, pues ésta era degradada por las proteasas endógenas de la bacteria. Por lo tanto, probamos cuatro cepas diferentes: HB101, MGT7, NH522 y TG1, las cuales fueron escogidas porque se les considera buenas cepas para la expresión de genes foráneos, ver Tabla 1.

La Fig. 17a. muestra la cepa HB101 transformada con los plásmidos pP905, pCSma y los controles, pMalc y pMalp; en ella se observa que sólo hay una buena inducción y sobre-expresión en el control pMalc, en el que se muestra una banda de 42 KDa correspondiente a la proteína MBP. Pero, en la Fig. 17b, el inmunoblot contra el anticuerpo anti-MBP, aún se observa la reacción inmunogénica al anticuerpo anti-MBP de la clona HB101/pCSma, presentándose un conjunto de bandas con un peso molecular aproximado a los 60 KDa. Los resultados de la expresión de la fusión en las otras tres cepas fueron similares a lo obtenido en la cepa HB101.

Otra opción fue introducir los plásmidos en una cepa deficiente en proteasas, lon<sup>-</sup>. Estas cepas fueron Y1089 y Y1090. En la Fig. 18a. se muestra un gel de poliacrilamida-SDS en el que tratamos de ver la expresión de las fusiones pCSma, pP338 y pP905, sin embargo, sólo se observó una banda de 42 KDa correspondiente a la inducción y expresión de la proteína MBP en la cepa Y1089. En la Fig. 18b se muestra el inmunoblot contra el anticuerpo anti-MBP y nuevamente observamos la reacción antígeno-anticuerpo de la fusión pCSma y del control MBP. Pero la reacción de la proteína de fusión se muestra de nuevo como un barrido de bandas de 60 KDa, menor al peso molecular real de la fusión de 72 KDa.

Era evidente que evitar la degradación proteolítica no era un problema sencillo de resolver, considerando que las bacterias no sólo tienen un tipo de proteasas sino varias (Goldberg, 1981).

d) Obtención de la proteína de fusión.

Una observación interesante es que hasta el momento en todos los geles teñidos con azul de Coomassie, en donde se encuentra la fusión pCSma inducida, la proteína de fusión expresada no se detecta como una banda claramente definida como en el caso de la proteína control, MBP; sino que sólo es posible detectarla mediante un ensayo tan fino como el inmunoblot. Es decir, independientemente de la degradación proteolítica, la cantidad de proteína de fusión inducida es extremadamente pequeña en relación

al extracto de proteínas totales de la bacteria, de tal forma que la banda correspondiente a la fusión se pierde entre todas ellas y no se hace evidente en un gel teñido con Coomassie. Por lo tanto, decidimos purificar la proteína de fusión mediante una columna de amilosa. Aunque se tratara de una fusión incompleta, degradada por proteasas, la idea era concentrar la proteína para enriquecer la banda correspondiente a la fusión, cortar con el factor  $X_a$ , pasar nuevamente por la columna de amilosa y recuperar el péptido correspondiente al receptor adrenérgico.

En la Fig. 19 se muestra la purificación de la proteína control, MBP, mediante la columna de amilosa, si la comparamos con el extracto total de proteínas de las bacterias inducidas (Y1089/pMalc) podemos ver que la cantidad de proteína MBP es relativamente buena.

No obstante, al realizar la purificación de la proteína de fusión los resultados no fueron los mismos. Si bien la inducción es buena para la proteína control, no lo es tanto para la proteína de fusión.

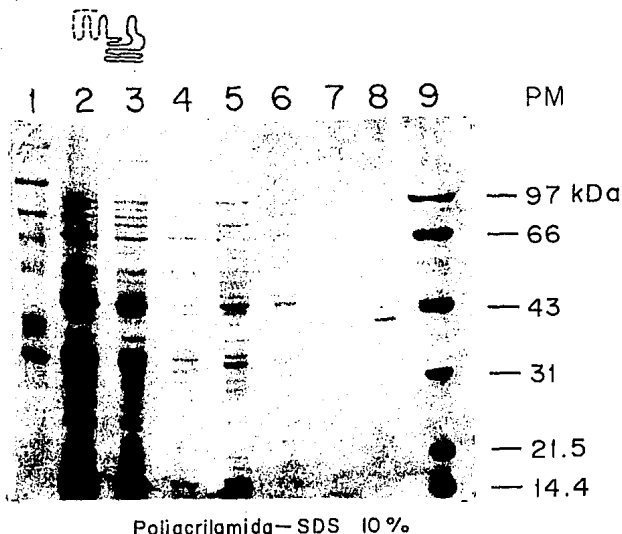
e) Condiciones de inducción de las bacterias.

Posteriormente revisando la literatura se encontró que el grupo del Dr. Yun había logrado mejorar los niveles de expresión del receptor adrenérgico  $\alpha_{2b}$  en *E. coli* cambiando las condiciones de inducción de las bacterias (Xia, 1993). Las cuales consistieron en: bajar la temperatura de 37°C a 30°C, aumentar el tiempo de inducción de 2 hrs. a 4 hrs. e inducir las bacterias en el momento que comienza la fase exponencial del crecimiento (D.O.<sub>600</sub> = 0.2) y no a la mitad de la misma (D.O.<sub>600</sub> = 0.6).

Luego entonces proseguimos a crecer las bacterias en estas condiciones y, la fracción soluble del extracto total de bacterias cosechadas fue pasado por la columna de amilosa con el objeto de retener la proteína de fusión que más tarde, mediante un lavado con buffer de maltosa sería recuperada. En la Fig. 20a. se muestra la proteína de fusión obtenida, se observa un conjunto de bandas de un

PM de alrededor de 60 KDa, es importante hacer notar, que el conjunto de bandas correspondientes a la fusión sólo se observa cuando es purificada a través de la columna de amilosa, mientras que en el extracto total de las proteínas de las bacterias inducidas, no es posible observarla. De manera que aunque se mejoró el nivel de expresión de la fusión, comparado con las demás proteínas de la bacteria la inducción aún sigue siendo baja.

Como siguiente paso quisimos corroborar que nuestra proteína de fusión estuviera constituida por la MBP y por un péptido correspondiente al receptor  $\alpha_{1u}$  de aproximadamente 18 KDa; y esto lo hicimos mediante una digestión con la proteasa Factor Xa que rompe justo en la unión de la proteína MBP con nuestra proteína de interés. En la Fig. 21. se puede ver dicha digestión, la cual resultó justamente en una banda de 42 KDa, peso molecular de la MBP, y en una banda de un PM mayor a los 14 KDa.

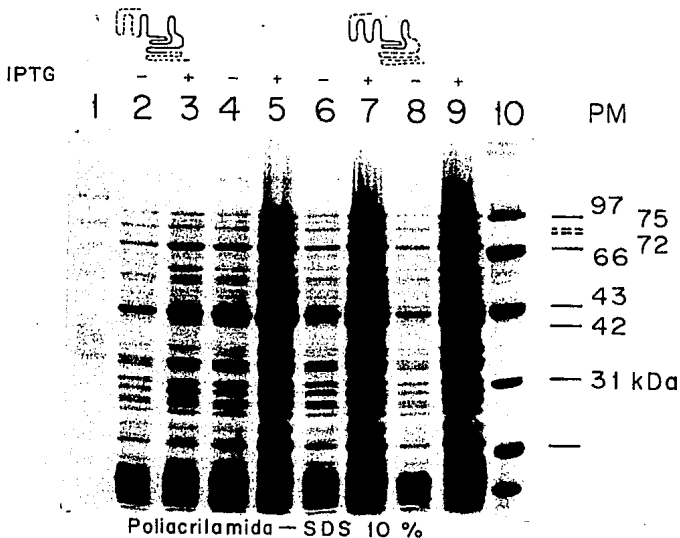


**Figura 12**

Inducción de la proteína de fusión pCPst.

Observese que en el carril 3, células inducidas, no se denota ninguna banda de 104 KDa, correspondiente a la fusión.

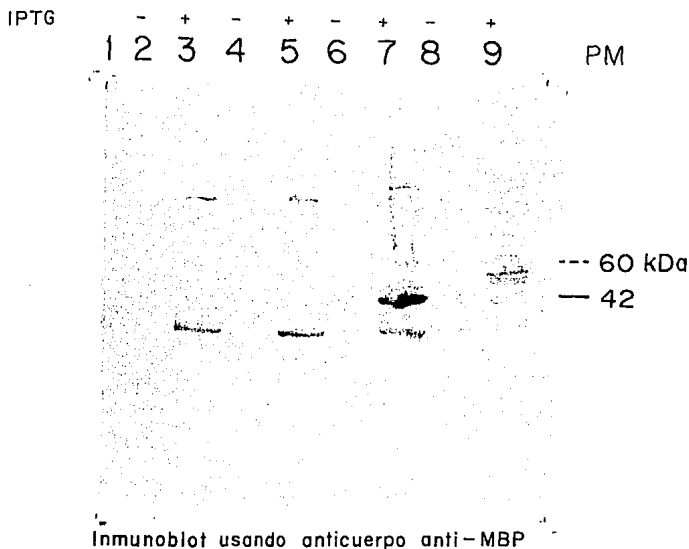
1. Marcadores de PM pre-teñidos
2. TB1/pCPst sin inducir
3. TB1/pCPst + IPTG 1 mM, 2 hrs a 37°C
4. TB1/pCPst Extracto crudo soluble en buffer de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
5. TB1/pCPst Extracto crudo insoluble en buffer de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
6. TB1/pCPst Fluido de choque osmótico
7. Fracción que no se pego a la resina de amilosa
8. MBP (maltose binding protein) pura.
9. Marcadores de PM estándares.



**Figura 13a.**

Expresión de las fusiones pCSma y pP905. Notese que en el carril 3, células inducidas, no se observa ninguna banda de 72 KDa, correspondiente a la fusión pCSma. En los carriles 7 y 9 tampoco se ve una banda de 75 KDa, de la fusión pP905.

1. Marcadores de PM pre-teñidos
2. TB1/pCSma sin inducir
3. TB1/pCSma inducida con IPTG 1mM, 2 hrs. a 37°C.
4. TB1/pMalp sin inducir
5. TB1/pMalp inducida con IPTG 1mM, 2 hrs. a 37°C.
6. TB1/pP905 sin inducir
7. TB1/pP905 inducida con IPTG 1mM, 2 hrs. a 37°C.
8. TB1/pP905 sin inducir
9. TB1/pP905 inducida con IPTG 1 mM, 2 hrs. a 37°C.
10. Marcadores de bajo PM estándares.



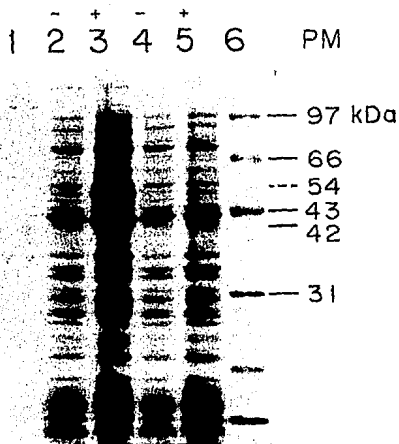
**Figura 13b.**

Análisis de Western-blot usando anticuerpo anti-MBP. En el carril 9, fusión pCSma inducida, se observa un conjunto de bandas alrededor de 60 KDa que dan una respuesta inmunológica al anticuerpo anti-MBP. De igual forma que la proteína MBP da respuesta, carril 7, banda de 42 KDa.

2. TB1/pP905 sin inducir
3. TB1/pP905 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
4. TB1/pP905 sin inducir
5. TB1/pP905 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
6. TB1/pMalp sin inducir
7. TB1/pMalp inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
8. TB1/pCSma sin inducir
9. TB1/pCSma inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C



IPTG

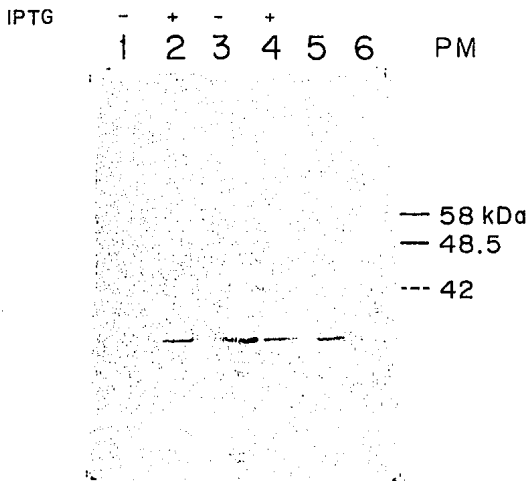


Poliacrilamida ~ SDS 10 %

Figura 14a.

Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie. En el carril 5, células inducidas, no se observa la expresión de la fusión pP338 de 54 kDa; sólo se ve la inducción de la MBP, banda de 42 kDa.

1. Marcadores de PM pre-teñidos
2. TB1/pMalp sin inducir
3. TB1/pMalp inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
4. TB1/pP338 sin inducir
5. TB1/pP338 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
6. Marcadores de bajo PM estándares.

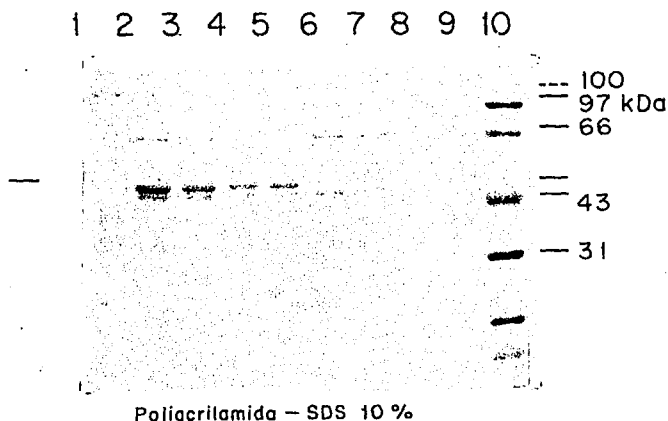


Immunoblot usando anticuerpo anti-MBP

**Figura 14b.**

Ensayo de Western-blot con el anticuerpo anti-MBP. Sólo se observa la respuesta inmunológica de la MBP con su anticuerpo, carril 4, banda de 42 KDa.

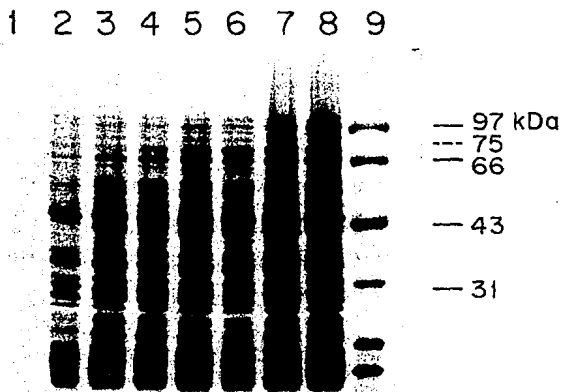
1. Marcadores de bajo PM estándares
2. TB1/pP338 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
3. TB1/pP338 sin inducir
4. TB1/pMalp inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
5. TB1/pMalp sin inducir
6. Marcadores de PM pre-teñidos



- 1 Marcadores de PM pre-teñidos
- 2 TB1/pMalc+IPTG tratado con SDS/NaOH
- 3 TB1/pMalc+IPTG tratada con SDS/NaOH y dializada con urea 8 M
- 4 TB1/pMalc+IPTG tratado con digitonina 2 %
- 5 TB1/pMalc+IPTG tratado con digitonina y sonificado
- 6 TB1/pCPst+IPTG tratada con SDS/NaOH
- 7 TB1/pCPst+IPTG tratada con SDS/NaOH y dializada con urea 8 M
- 8 TB1/pCPst+IPTG tratada con digitonina 2 %
- 9 TB1/pCPst+IPTG tratada con digitonina 2 % y sonificado
- 10 Marcadores bajo PM estandares

**Figura 15.**

Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie. Las nuevas condiciones que se utilizaron para solubilizar los cuerpos de inclusión no mostraron cambios para visualizar la proteína de fusión. Sólo se ve claramente la inducción de la MBP, carril 2, banda de 42 KDa.



Poliacrilamida — SDS 10 %

- 1 Marcadores de PM pre-teñidos
- 2 TB1/pP905
- 3 TB1/pP905+IPTG 2 hrs a 37 °C
- 4 TB1/pP905+PMSF 2 hrs a 37 °C
- 5 TB1/pP905+ IPTG Y PMSF 2 hrs a 37 °C
- 6 TB1/pP905+IPTG 4 hrs a 23 °C
- 7 TB1/pP905+ IPTG 4.5 hrs a 30 °C y T.N. en frio con PMSF
- 8 TB1/pP905+ IPTG 2 hrs a 37 °C y T.N. en frio con PMSF
- 9 Marcadores de bajo PM. estandares

Figura 16.

Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie. Células tratadas con PMSF 2mM, un inhibidor de proteasas. No se observa ninguna diferencia en la sobreexpresión de la fusión pP905.

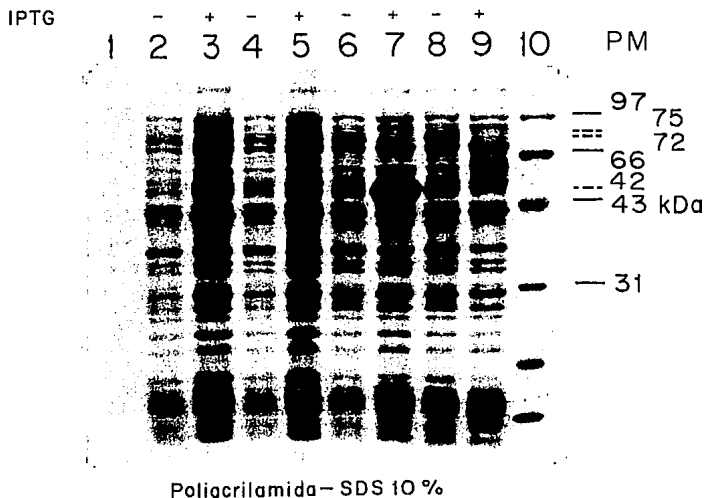
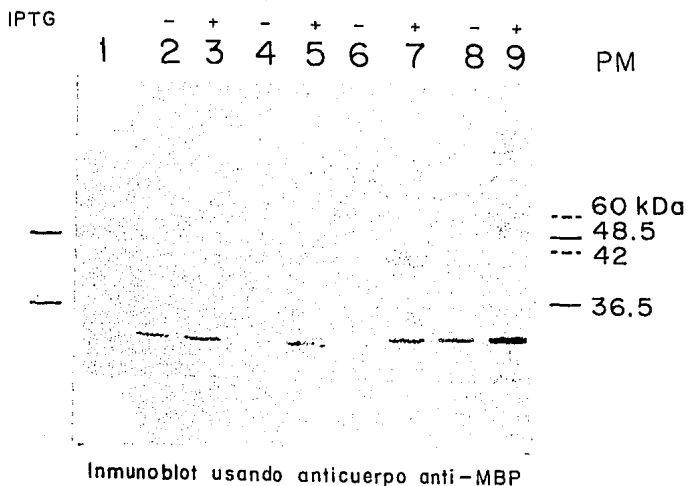


Figura 17a.

Expresión de las clonas pP905 y pCSma en la cepa HB101. Notese que sólo se observa una banda sobresaliente de 42 KDa correspondiente a la proteína MBP, carril 7.

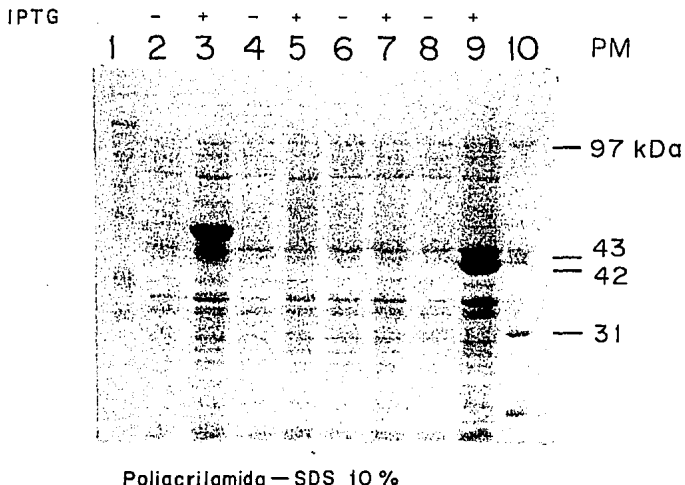
1. Marcadores de PM pre-teñidos
2. HB101/pMalp sin inducir
3. HB101/pMalp inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
4. HB101/pP905 sin inducir
5. HB101/pP905 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
6. HB101/pMalc sin inducir
7. HB101/pMalc inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
8. HB101/pCSma sin inducir
9. HB101/pCSma inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
10. Marcadores de bajo PM estándares



**Figura 17b.**

Análisis de Western-blot, usando el anticuerpo anti-MBP. Observe que además de la respuesta inmunológica de la MBP, carriles 3 y 7, se ven un conjunto de bandas de aproximadamente 60 kDa, correspondientes a la fusión pCSma, carril 9.

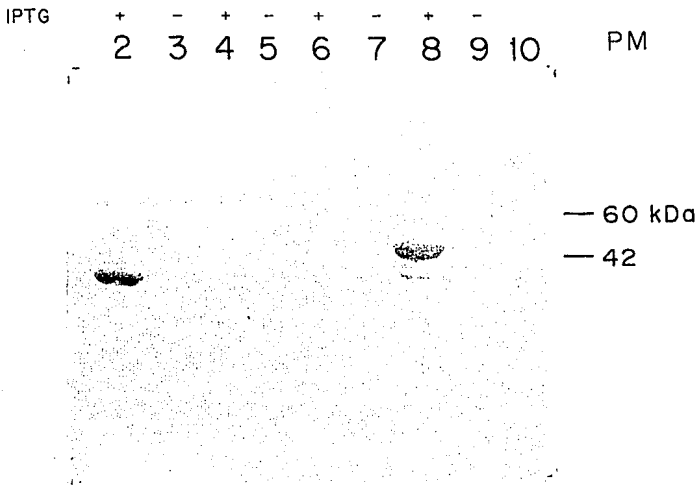
1. Marcadores de PM pre-teñidos
2. HB101/pMalp sin inducir
3. HB101/pMalp inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
4. HB101/pP905 sin inducir
5. HB101/pP905 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
6. HB101/pMalc sin inducir
7. HB101/pMalc inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
8. HB101/pCSma sin inducir
9. HB101/pCSma inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C



**Figura 18a.**

Expresión de las fusiones pP905 y pCSma en la cepa Y1090. Sólo se ve claramente la inducción de la proteína MBP, carril 3, con una banda de 42 KDa.

1. Marcadores de PM pre-teñidos
2. Y1089/pMalc sin inducir
3. Y1089/pMalc inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
4. Y1090/pCSma sin inducir
5. Y1090/pCSma inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
6. Y1090/pP338 sin inducir
7. Y1090/pP338 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
8. Y1090/pP905 sin inducir
9. Y1090/pP905 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
10. Marcadores de bajo PM estándares



Immunoblot usando anticuerpo anti-MBP

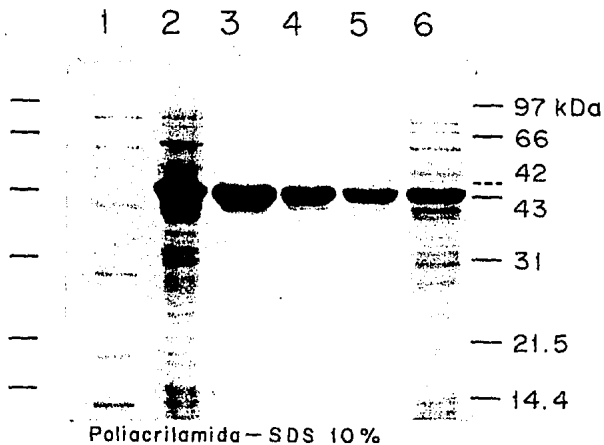
**Figura 18b.**

Western-blot usando el anticuerpo anti-MBP.

Notese que además de la respuesta inmunológica de la MBP se observa un conjunto de bandas de aproximadamente 60 KDa que corresponden a la fusión pCSma, carril 6.

2. Y1090/pP905 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
3. Y1090/pP905 sin inducir
4. Y1090/pP338 inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
5. Y1090/pP338 sin inducir
6. Y1090/pCSma inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
7. Y1090/pCSma sin inducir
8. Y1089/pMalc inducida con IPTG 1mM, 2hrs. a 37°C
9. Y1089/pMalc sin inducir
10. Marcadores de PM pre-teñidos

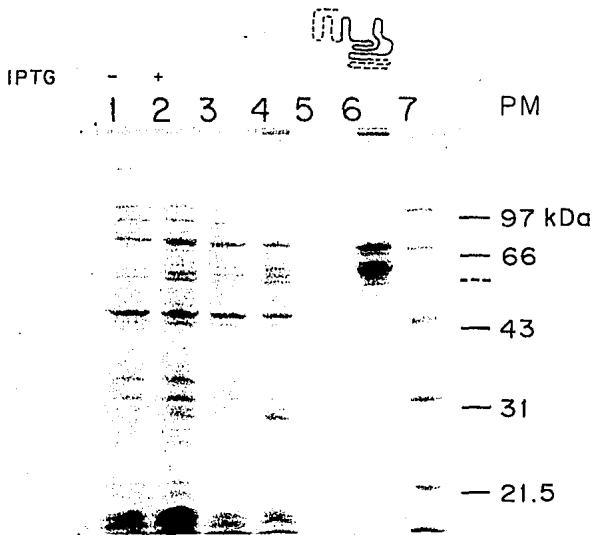




- 1 Marcadores de bajo PM estandar
- 2 Y1089/pMalc + IPTG
- 3 MBP obtenida de la columna de amilosa (30 ug)
- 4 MBP " " " (15 ug)
- 5 MBP " " " (7.5 ug)
- 6 Y1089/pMalc + IPTG

Figura 19.

Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie. Proteína MBP purificada eluida de la columna de amilosa con maltosa.

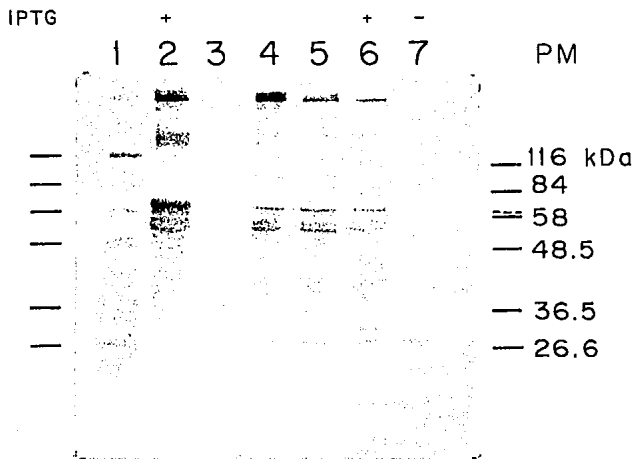


Poliacrilamida - SDS 10 %

Figura 20a.

Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie. Observe, la expresión de la proteína de fusión pCSma como un conjunto de bandas de alrededor de 60 KDa. (Esta expresión solo se había observado hasta ahora mediante un inmunoblot).

1. Y1090/pCSma sin inducir
2. Y1090/pCSma inducida con IPTG 1mM, 4hrs. a 30°C
3. Y1090/pCSma Fracción soluble en buffer de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$
4. Y1090/pCSma Fracción insoluble en buffer de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$
5. Fracción que no se pegó a la resina de amilosa
6. Proteína de fusión, pCSma, eluida con maltosa de una columna de amilosa.
7. Marcadores de bajo PM estándares



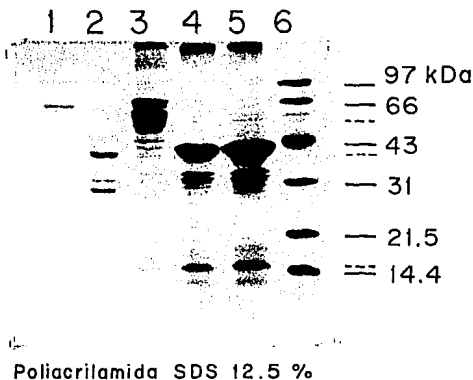
Immunoblot usando anticuerpo anti-MBP

**Figura 20b.**

Western-blot usando el anticuerpo anti-MBP.

En los carriles 4, 5 y 6, células inducidas, se observa una respuesta inmunológica al anticuerpo, sin embargo, en el carril 2, proteína purificada, esta respuesta se ve claramente incrementada.

1. Marcadores de PM pre-teñidos
2. Proteína de fusión, pCSma, eluida con maltosa de una columna de amilosa.
3. Fracción que no se pegó a la resina de amilosa
4. Y1090/pCSma Fracción insoluble en buffer de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$
5. Y1090/pCSma Fracción soluble en buffer de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$
6. Y1090/pCSma inducida con IPTG 1mM, 4hrs. a  $30^\circ\text{C}$
7. Y1090/pCSma sin inducir



**Figura 21.**

Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie. Carril 3, proteína de fusión pCSma purificada mediante una columna de amilosa. Carriles 4 y 5, proteína de fusión cortada con el factor  $X_a$ . Notese como se recupera la banda de 42 KDa correspondiente a la MBP y se genera una banda nueva mayor a 14 KDa, que corresponde al segmento del receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico.

1. MBP-paramiosina
2. MBP-paramiosina + factor  $X_a$
3. Proteína de fusión MBP- $\alpha_{1B}$  (50  $\mu$ g)
4. Proteína de fusión MBP- $\alpha_{1B}$  (100  $\mu$ g) + factor  $X_a$
5. Proteína de fusión MBP- $\alpha_{1B}$  (200  $\mu$ g) + factor  $X_a$
6. Marcadores de bajo PM estándares

## DISCUSION

### Construcción de las fusiones

En este trabajo se intentó la sobre-expresión del receptor  $\alpha_{1\beta}$  adrenérgico en *E. coli* como una proteína de fusión, mediante el sistema de la MBP (maltose binding protein); y se construyeron cuatro fusiones distintas del receptor con dicha proteína.

No se llevo a cabo la construcción de una fusión con el receptor completo porque no se conocía la distancia, en número de pares de bases, corriente arriba de la terminación 5', a la cual corta la enzima de restricción EcoR I, por la construcción no iba a quedar en fase para que se leyera la proteína correcta. Sin embargo, aún las fusiones con el receptor truncado podían servir para nuestro objetivo, obtener anticuerpos capaces de inmunoprecipitar al receptor.

### Expresión disminuida

Encontramos que de las cuatro fusiones construidas sólo se expresó la fusión del plásmido pCSma. Además el nivel de expresión fue muy bajo y la forma de detectarla fue mediante un inmunoblot, en donde se observó la presencia de un conjunto de bandas de proteína de peso molecular mayor al de la MBP, que fueron inmunoreactivas al anticuerpo anti-MBP. Esta construcción genética se realizó en el plásmido pMalc, tiene una longitud de 822 pb, esta formada por los cuatro últimos segmentos transmembranales del receptor y un fragmento del extremo carboxilo y su peso molecular es de 72 KDa.

Es importante hacer notar que el tamaño de la fusión no fue decisivo para su expresión, ya que la clona pCSma es de una longitud intermedia de entre las cuatro fusiones que se construyeron. Tampoco fue su estructura lo que determinó su expresión pues en realidad las cuatro fusiones estaban constituidas por lo menos con tres segmentos transmembranales.

El hecho de que la expresión de la proteína no fuera tal alto como uno deseaba se debe a varios factores:

a) El tipo de plásmido que se utilice, generalmente cuando se desea potenciar la expresión de una proteína se usan los plásmidos denominados relajados o de alto número de copias, ya que se replican de forma autónoma al cromosoma bacteriano y tienen un número de copias de 10 a 500 por célula.

b) El promotor, generalmente un promotor fuerte para asegurar un alto nivel de transcripción, en nuestro caso el promotor *lac*, es una combinación de los promotores *lac* y *trp*.

c) La frecuencia de uso de codones, si el fragmento clonado contiene codones raramente usados por *E. coli* el resultado puede ser un bajo nivel de expresión. Pero este no parece ser el caso, ya que se han realizado trabajos en los que se ha expresado a los receptores  $\beta$  adrenérgicos (Marullo, 1988; Marullo, 1989; Breyer, 1990; Chapot, 1990), estas proteínas pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, con una estructura típica de siete dominios transmembranales, una estructura secundaria muy similar a los receptores  $\alpha$  adrenérgicos.

d) La estabilidad de la proteína. La estructura de la proteína que deseamos expresar tiene características hidrofóbicas por lo que le es difícil mantenerse estable en el citoplasma, y probablemente estuviese formando agregados o cuerpos de inclusión (partículas densas que contienen proteínas precipitadas) debido a la baja solubilidad de la proteína, a la tasa de síntesis y a las condiciones de crecimiento (Uhlén, 1990).

Por lo tanto, decidimos tratar a las células con digitonina al 2% (Lomasney, 1986) o dializando contra una solución de urea 8 M (Nagai, 1987), pero en ambos casos, el patrón de bandas de las proteínas se observó igual después de los tratamientos, quizá

estos métodos no fueron lo suficientemente eficaces para solubilizar la proteína y hacer que entrara al gel.

En los geles de proteínas teñidos con azul de Coomassie así como en los inmunoblot se observa claramente que gran parte de la proteína se queda en el origen y no logra entrar al gel, una sugerencia dada para evitar ese problema fue tratar a las muestras con buffer Laemmli de manera distinta. Es decir, comúnmente las muestras en Laemmli eran hervidas durante 5 minutos, en cambio ahora serían incubadas a temperaturas más bajas: 70, 50 y 30°C antes de cargarse en el gel (Shepherd, 1978). Pero los resultados fueron muy similares a los geles anteriores, no se observó ninguna banda nueva que mostrara que la proteína había entrado al gel, (los datos no se muestran).

La mayoría de las proteínas expresadas con mayor éxito, en sistemas de proteínas híbridas, han sido proteínas con una estructura hidrofílica, que les permite mantenerse solubles en el citosol, por ejemplo: la paramiosina, la troponina C, la ribonucleasa A pancreática (Nagai, 1987); ó proteínas obtenidas como cuerpos de inclusión, como por ejemplo: la somatostatina, la insulina cadena A y B, la calcitonina, la hormona de crecimiento humana, la mioglobina y la angiotensina (Goeddel, 1990).

f) La toxicidad del producto para la célula. Hay varias formas para tratar a los productos que son tóxicos para las células, uno de ellos es utilizar un vector con un sistema de secreción. En nuestro caso el vector pMalp codifica por un péptido señal que exporta la proteína de fusión al periplasma de la bacteria, además la proteína a la cual esta fusionada el receptor es una proteína periplásmica que se transporta maltosa (MBP). Sin embargo, las fusiones realizadas en dicho plásmido, pP338 y pP905, no se expresaron mejor que la fusión pCSma, que fue construida en el pMalc, el cual mantiene a la fusión en el citoplasma.

### **Cepas Hospederas**

La hidrólisis de uniones peptídicas es un proceso metabólico normal en bacterias en crecimiento, por ejemplo, en los procesos de maduración de proteínas membranales y en la inactivación de ciertas proteínas reguladoras. Sin embargo, la degradación proteolítica en bacterias es más acentuada en proteínas alteradas estructuralmente como es el caso de proteínas foráneas provenientes de DNA clonado.

Es evidente que nuestra proteína de fusión resultó ser particularmente sensitiva a la actividad proteolítica. Esto lo podemos ver al detectar un conjunto de bandas de un peso molecular aproximado a 60 KDa, menor al PM correspondiente a la fusión de 72 KDa. No obstante, en los trabajos realizados en la expresión de los receptores  $\beta$  adrenérgicos se presenta el mismo problema, y se menciona que la proteína de fusión es más sensible a la degradación proteolítica que sus productos de corte, es decir al receptor sólo. También comentan que al intentar expresar los distintos subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos de humano y de pavo se observó una degradación proteolítica diferencial dependiendo de la variación en las secuencias primarias de los receptores. Lo que nos sugiere que el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico que pertenece a la misma gran familia de receptores acoplados a proteínas G presenta una mayor sensibilidad a las proteasas endógenas de la bacteria.

Estudios genéticos han mostrado que mutantes en el gene *lon* reducen la capacidad de las células para degradar proteínas anormales *in vivo*. De manera que intentamos expresar nuestras fusiones del receptor en una cepa *lon-*, deficiente en proteasas, no obstante, el uso de una mutante *Lon* no siempre resuelve el problema, como lo muestran nuestros resultados, probablemente otras proteasas endógenas de la bacteria sean las responsables de la degradación de nuestra fusión (Goldber, 1981).



### Condiciones de Crecimiento

Por otra parte, establecer las condiciones de crecimiento e inducción satisfactorias es un paso muy importante en la expresión exitosa de una proteína.

Inicialmente las bacterias se crecían a 37°C hasta alcanzar un D.O.<sub>600</sub> de 0.5 y en ese momento eran inducidas con IPTG e incubadas por 2 hrs. más a la misma temperatura. Pero la sobre-expresión que se obtenía era tan baja que solo se detectaba mediante un ensayo de inmunoblot. El nivel de expresión mejoró notablemente cuando las bacterias se crecieron a 37°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.2, momento en el que fueron inducidas con IPTG e incubadas por 4 hrs a 30°C (Xia, 1993). Bajo estas condiciones, el crecimiento exponencial de las bacterias se alcanza durante el período de inducción, de manera que la proteína de fusión se está expresando en un momento en el que las bacterias presentan su mayor actividad metabólica así como su mayor capacidad de síntesis de proteínas mientras que en las condiciones anteriores, la síntesis de proteínas va decreciendo y en consecuencia la expresión de la proteína de fusión se ve disminuida.

Por otra parte, el ver incrementada la tasa de degradación de una proteína a altas temperaturas, podría ser el reflejo de la inducción de procesos proteolíticos, los cuales requieren energía metabólica, la probabilidad de incrementar la desnaturalización así como la concentración de conformaciones anormales por proteínas normales (Ingraham, 1987).

Es importante recalcar que si bien estas nuevas condiciones de crecimiento nos ayudaron a mejorar el nivel de expresión de la fusión al punto de poderla observar en un gel de proteínas teñido con azul de Coomassie, no hubo disminución en la degradación de la fusión.

### **Experimentos Recientes**

Por otro lado, una vez que se logró un mejor nivel de expresión en la fusión pCSma, se obtuvo la cantidad mínima necesaria de proteína para inocular a los conejos y generar anticuerpos contra dicha proteína de fusión. Una vez obtenido el suero, los anticuerpos fueron probados mediante un ensayo de western-blott y se encontró que los anticuerpos daban una respuesta inmunoreactiva tanto con la proteína MBP como con la proteína de fusión. Sin embargo, al tratar de bloquear la unión del ligando al receptor con los anticuerpos no se observó ningún desplazamiento del ligando radioactivo. Estos resultados muestran que los anticuerpos obtenidos no son necesariamente el epítipo correspondiente al sitio de unión al ligando del receptor, pero como lo muestran los resultados del inmunoblot se tienen anticuerpos contra otra región del receptor, lo importante sería probarlos en un ensayo de inmunoprecipitación.

### **Alternativas**

Estudios sobre proteínas de "heat shock" han sugerido que las células deficientes a la respuesta de "heat shock" son también defectivas a proteólisis. Estas cepas bacterianas podrían ser una opción para la expresión de nuestra proteína de fusión.

Otras mutantes de utilidad podrían ser las *degP*, las cuales presentan una proteasa periplásmica inactiva, la mutación en dicha proteasa podría ayudar a estabilizar algunas proteínas exportadas.

Otra posibilidad es que la degradación de la proteína quizá se este llevando a cabo a nivel de la transcripción del RNA mensajero, el cual puede ser poco estable al tratarse de un transcrito de una proteína anormal para la bacteria, y por ello las bacterias deficientes en proteasas no logran resolver el problema de una proteína truncada.

Además, aún faltan de probar las fusiones pCPst, pP338 y pP905 en las nuevas condiciones de crecimiento en las que se obtuvo un buen nivel de expresión para la construcción pCSma.

Y por la estructura que comprenden del receptor las fusiones pCPst y pP905 tienen una alta posibilidad de que sus anticuerpos correspondientes bloquearán el pegado del ligando al receptor.

Por último, podríamos intentar nuevamente la solubilización de posibles agregados de la proteína mediante un método en el que las muestras en laemmlí son tratadas directamente con guanidina quizá se obtengan mejores resultados.

## CONCLUSIONES

1) Se obtuvieron cuatro construcciones genéticas, las cuales comprenden diferentes regiones del receptor adrenérgico.

2) Sólo la fusión construida con los cuatro últimos dominios transmembranales del receptor y una porción del extremo carboxilo se expresó en las nuevas condiciones de crecimiento que se probaron. Las otras tres fusiones aun no se han probado en las nuevas condiciones.

3) La fusión expresada, pCSma, muestra un peso aproximado de 60 KDa menor al peso molecular esperado, por lo que concluimos que la fusión expresada era el producto de una degradación proteolítica debida a preteasas endogenas de la bacteria que reconocen a la proteína de fusión como una proteína anormal quizá tóxica para ella.

4) Los anticuerpos obtenidos del suero de conejos inmunizados con la proteína de fusión no bloqueron el "binding", sin embargo, si presentaron una respuesta inmunoreactiva ante la proteína MBP y la proteína de fusión, por lo tanto creemos que la siguiente prueba a realizar es la inmunoprecipitación del receptor con dichos anticuerpos.

#### LITERATURA CITADA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. (1987) "Biología Molecular de la Célula". Ed. Omega S.A. Barcelona. pp. 768-807.
- Bahouth, S., Wang, H. and Malbon, C. (1991) TIPS Reviews. 12(9):338-343.
- Berridge, M. (1985) Sci. Am. 253(4): 112-122.
- Berridge, M. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56: 159-193
- Bertin, B., Freissmuth, M., Breyer, R., Schütz, W., Strosberg, A. & Marvilo, S. (1992) J. Biol. Chem. 267(12): 8200-8206.
- Breyer, R., Strosberg, A. & Guillet, J. (1990) The EMBO Journal. Vol.9 No.9 pp 2679-2684.
- Bylund, D. (1992) FASEB J. 6(3): 832-839.
- Chapot, M., Eshdat, Y., Marullo, S., Guillet, J., Charbit, A., Strosberg, A. & Delavier, C. (1990) Eur. J. Biochem. No.187. 137-144.
- Cotecchia, S., Schwinn, D., Randall, R. & Lefkowitz, R. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7159-7163.
- Cotecchia, S., Ostrowski, J., Kjelberg, M., Caron, M. & Lefkowitz, R. (1992) J. Biol. Chem. 267 (3): 1633-1639.
- Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1986) "Molecular Cell Biology". Scientific American Books. New York. pp 667-693.
- Devlin, T. (1992) Textbook of Biochemistry. Wiley-Liss New York. pp 808-821.
- Fain, J.N. and García-Saíñz, J.A. (1980) Life Sci. 26, 1183.
- Gao, B. & Kunos, G. (1993) GENE 121: 243-247.
- Gardner, E., Simmons, M. and Snustad, P. (1984) Principles of Genetics. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp 392-407.
- García Saíñz, J. A. (1987) "Hormonas: Mensajeros Químicos y Comunicación Celular". col. "La Ciencia desde México." Ed. Fondo de Cultura Económica. México. pp 77-82.

- García Sainz, J. A. (1988) en: "Mensaje Bioquímico" vol. X pp. 471-478.
- Goeddel, D. (1990) *Methods in Enzymology*. Academic Press. Inc. San Diego. Vol. 185, 55-233 pp.
- Gray, G., Baldrige, J., Mckeown, K., Heyneker, H. and Chang, C. (1985) *Gene*. 39:247.
- Grossman, L., Wu, R. and Moldave, K. (1983) *Methods in Enzymology*. Academic Press. New York. 100: 293-309.
- Grossman, L. , Wu, R. and Moldave, K. (1983) *Methods in Enzymology*. Academic Press. New York. 101: 167-193
- Guan, C. L. , Riggs, P. and Inouye, H. (1988) *Gene* 67, 21.
- Harold, F. (1986) *The vital force: A study of Bioenergetics*. W. Freeman and Company. New York. pp 473-522.
- Harrison, F. M. (1986) "The Vital Force: A Study on Bioenergetics" W.H. Freeman & Co. New York. pp. 473-512.
- Harrison, J., Pearson, W. , Lynch, K. (1991) *Trends in Pharmacol. Sci.* vol 12. pp. 62-67.
- Hoffmann, B. & Lefkowitz, R. (1980) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 581-608.
- Ingraham, J. Brooks, K. Magasanik, B. Shaechter, M. & Umberger, E. (1987) *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. American Society for Microbiology. Washinton, D.C. pp 684-691.
- Karp, G. (1984) "Cell Biology." Mc Graw Hill Book Co. New York. pp. 186-197.
- Kjelsberg, M. , Cotecchia, S. , Ostrowski, J. , Caron, M. & Lefkowitz, R. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (3): 1430-1433.
- Kunos, G. & Gao, B. (1993) *GENE* 131:243-247.
- Lefkowitz, R. (1981) *Receptor Regulation*. Chapman & Hall. New York. pp. 85-91.
- Lefkowitz, R. , Caron, M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (11): 4993-4996.
- Lefkowitz, R. , Kobilka, B. , Benovic, J. , Bouvier, M. & Cotecchia, S. (1988) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol LII.

- Lomasney, J. , Leeb-Lundberg, F. , Cotecchia, S. & Reagan, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 (17): 7710-7716.
- Lomasley, J. , Cotecchia, S., Lefkowitz, R. & Caron, M. (1991) *Biochimica et Biophysica Acta.* 127-139.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maina, C. , Rigg , P. , Grandea III, A. , Slatko, B. , Moran, L. , Tagiamonte, J., Mc Reynold, L. & Guan, C. (1988) *Gene.* 74: 365-373.
- Maniatis, T., Fritson, E. F., and Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marullo, S. Delavier, C. Eshdat, Y. Strosberg, D. & Emorine L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 85 pp 7551-7555.
- Marullo, S. Delavier, C. Guillet, J. Charbit, A. Strosberg, D. & Emorine, L. (1989) *Bio/technology* Vol. 7 pp 923-927.
- Marston, F. (1986) *Biochem. J.* 240:1-12.
- Mather, J. (1984) *Mammalia Cell Culture.* The Population Council and The Rockefeller University. New York. pp 17-21.
- Mathews, C. K. and van Holde, K. E. (1990) *Biochemistry.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. New York. pp 797-820.
- Miller, L. (1988) *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177-199.
- Minneman, K. (1988a) *Pharmacol. Rev.* 40, 87.
- Minneman, K. (1988b) *Pharmacological Reviews* 40(2):87-119.
- Nagai, K. and Thogersen, H. *Methodos in Enzymology.* Academic Press. Inc. San Diego. Vol 153, pp 461-481.
- Norman, A. (1987) *Hormonas.* Academic Press, Inc. New York. pp 471-478.
- O'Reilly, D., Miller, L. and Luckow, V., (1992) *Baculovirus expression vectors. A laboratory manual.* W.H. Freeman and Company. New York.
- Perez, D.M., Piascik, M.T. and Graham, R.M. (1991) *Molecular Pharmacology* 40, 876-883.

- Rudy, B. and Iversson, L. (1992) *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. San Diego. Vol. 207 pp 423-431.
- Ruffolo, R. (1987) *The alpha-1 Adrenergic Receptors*. Humana Press. New Jersey pp 19-36.
- Schrödinger, E. (1943) ¿Qué es la vida? Muy Interesante.
- Strader, C., Candelere, M., Hill, W., Sigal, I. and Dixon, R. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:13572.
- Strosberg, D. and Marullo, S. (1992) *TIPS*. 13:95-98.
- Sutherland, E. W. (1972) *Sciense-* 117:401-408.
- Tanaka, S., Oshima, T., Ohsue, K., Ono, T., Oikawa, S., Takano, I., Noguchi, K., Kangawa, Minamino, N. and Matsuo, H. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 1741.
- Villa-Komaroff, L., Efstratiadas, A., Broonie, S., Lomedico, P., Tizard, R., Nabe, S., Chick, W. and Gilbert, W. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3727.
- Walker, J. and Gingold, E. (1988) *Molecular Biology and Biotechnology*. Royal Society of Chemistry. pp 87-105.
- Wetzel, R., Heyneker, Goeddel, G., Thurman, G. and Goldstein, A. (1980) *Biochemistry* 19, 6096.
- Wilson, J. and Foster, D. (1985). *Textbook of Endocrinology*. W. B. Saunders company. Philadelphia.
- Wu, D., Katz, A., Lee, C. and Simon, M. (1992) *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267, No.36 pp 25798-25802.
- Wu, R. and Grossman, L. (1987) *Methods in Enzymology*. Academic Press. Inc. San Diego. Vol. 153, pp 517-519.
- Yansura, D., Crea, R., Hirose, T., Kraszeuski, A. Itakura, K. and Riggs, A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 106. Roth, N., Lefkowitz, R. and Caron, M. Structure and Function of the adrenergic receptor family.
- Xia, Y., Chhajlani, V. & Wikberg, J. (1993). *European Journal of Pharmacology*. Vol. 246, pp 129-133.