UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES DE RECEPTORES GABAc

POR

ATAULFO MARTINEZ TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

NOVIEMBRE DEL 2000

ATAULFO MARTINEZ TORRES

TD
QM451
.M37
c.1

1080111681

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES DE RECEPTORES $GABA_C$

Por

Ataúlfo Martínez Torres

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Noviembre del 2000

TD
QM4 1
.M37

BMU Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES DE RECEPTORES GABAc

Aprobación de Tesis

DR. RICARDO MILEDI
(Director)

DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
(Co-Director)

DRA. HERMINIA MARTINEZ RODRIGUEZ

DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA

DR. JORGE VALENZUELA RENDÓN

DRA. AGNES REVOL

DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

RESUMEN

Ataúlfo Martínez Torres **Fecha de Graduación: Noviembre, 2000**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: Estudios Funcionales en Receptores $GABA_C$

Número de páginas: 93 **Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Area de estudio: Biología Molecular de Neuroreceptores

Propósito y Método del Estudio: El presente trabajo describe las características moleculares y funcionales de la familia de neuroreceptores $GABA_C$, la cual es el producto de la expresión de al menos tres genes diferentes (ρ1, ρ2 y ρ3) que codifican para los tres tipos de subunidades que pueden formar el receptor. Este estudio se abordó empleando técnicas de biología molecular y electrofisiología, usando como modelo experimental-funcional al oocito de *Xenopus laevis*. En la primera parte se describe la clonación y el análisis funcional de dos nuevas formas alternativas del receptor ρ1 humano (llamadas ρ1Δ51 y ρ1Δ450), contrastando las diferencias entre el receptor original y las isoformas recién clonadas. Posteriormente se presenta el análisis de la expresión de los receptores $GABA_C$ en diversas áreas del SNC. Esta parte se desarrolló empleando métodos de detección y clonación molecular, hibridación *in situ* y expresión funcional en oocitos de *Xenopus*. Finalmente, se estudiaron los posibles mecanismos de desensibilización del receptor ρ1, para lo cual se siguieron dos estrategias. En la primera se estudió el papel que juegan los mecanismos de fosforilación en la actividad del receptor. Para ésto se mutaron *in vitro* codones blanco para la enzima proteína cinasa C. En la segunda alternativa, se determinó si el dominio molecular que forma el canal iónico del receptor está involucrado en la baja tasa de desensibilización de ρ1, mediante la construcción de genes quimera entre ρ1 y la subunidad α1 del receptor de rápida desensibilización $GABA_A$.

Contribuciones y Conclusiones: Se demostró que ρ1Δ51 forma receptores funcionales cuando son expresados en la membrana del ovocito, mientras que la isoforma ρ1Δ450 no es funcional, aún y cuando su RNA es traducido eficientemente por el oocito. El estudio de la distribución de los receptores $GABA_C$ condujo a la determinación de la distribución celular en cerebelo, a la clonación y al análisis funcional de tres nuevos DNAcs obtenidos a partir de bancos de DNAc de cerebelo bovino (ρ1 y ρ2) y cerebro de rata (ρ3). Finalmente, el estudio de los mecanismos de desensibilización del receptor ρ1 mostró que los receptores mutados en los sitios de fosforilación tienen las mismas propiedades que los receptores silvestres mientras que los experimentos con DNA quimérico demostraron que el dominio que forma el canal iónico del receptor (*i.e.* el segundo segmento transmembranal) no es suficiente para transferir las características de desensibilización rápida y que para eso se requiere la cooperación de varios dominios distribuidos a lo largo de la molécula del receptor.

FIRMA DE LOS ASESORES

Dr. Ricardo Miledi Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS iv

LISTA DE ABREVIATURAS vi

AGRADECIMIENTOS vii

RESUMEN AUTOBIGRAFICO viii

Capítulo Página

1. INTRODUCCION

1

1.1 Generalidades de los Receptores del GABA 1

1.1.1 Los Receptores del GABA Inhibe el potencial Sináptico 1

1.1.2 Estructura de los Receptores Ionotrópicos 4

1.2 Características de los Receptores $GABA_C$ 5

1.2.1 Los Receptores $GABA_C$ se Expresan en la Retina de los Vertebrados 5

1.2.2 Existen al Menos tres Tipos de Subunidades de Receptores $GABA_C$ 6

1.2.3 Diferencias Entre los Receptores $GABA_A$ y $GABA_C$ 8

1.2.4 Formas Alternativas de los Receptores $GABA_A$ 10

1.3 Mecanismos de desensibilización de Receptores Ionotrópicos 12

1.3.1 Papel de la Fosforilación en la desensibilización de receptores ionotrópicos 12

1.3.2 Elementos estructurales del Recpetor y su Papel en la desensibilización 13

1.4 El Oocito de *Xenopus* Como Modelo Experimental Para Estudiar Neuroreceptores y Canales Ionicos 14

1.4.1 Generalidades del oocito de *Xenopus laevis* 14

1.4.2 Los Oocitos de *Xenopus* Traducen RNAm Heetrólogo 15

1.5 Justificación 16

1.6 Objetivo General 16

1.7 Objetivos Particulares 16

2. MATERIAL Y METODOS 17

2.1 Origen de los Reactivos 17

2.2 Material Biológico y Equipo 18

2.3 Clonación y Estudios Funcionales y de Distribución de Formas Alternativas del la Subunidad ρ1 18

2.3.1 Tamizaje de Bibliotecas de DNAc de Retina 18

2.3.2 Propagación de la Biblioteca de DNAc y Transformación de Bacterias 19

2.3.3 Tamizaje Molecular 20

2.3.4 Re-propagación 20
2.3.5 Plásmidos de Expresión y Síntesis de Transcritos *in vitro* (RNAc) 21
2.3.6 Aislamiento de Oocitos de *Xenopus* y registro de Corrientes por la Técnica de dos Microelectrodos y Fijación de Voltaje 23
2.3.7 Construcción de Receptores en Fusión con la Proteína Verde Fluorescente (GFP) 24
2.3.8 Tamizaje de las Isoformas del Receptor ρ1 en el SNC 25
2.4 Clonación Molecular, Análisis Funcional y Determinación de la Distribución de Receptores $GABA_C$ en el Sistema Nervioso Central 27
2.4.1 Preparación del Tejido, Aislamiento de RNA y Análisis Funcional 27
2.4.2 Análisis por RT-PCR 27
2.4.3 Hibridación *in situ* 28
2.4.5 Tamizaje de una Biblioteca de DNAc de Cerebro de Rata 29
2.5 Mutaciones en los Sitios de Fosforilación del Receptor ρ1 y Co-expresión con Receptores Asociados a Proteínas G 29
2.5.1 Mutaciones Dirigidas 29
2.5.2 Co-expresión de Receptores de Angiotensina (AT1) y ρ1 31
2.5.3 Expresión de la Segunda Asa Intracelular de ρ1 en *E. coli* y Fosforilación *in vitro* 31
2.6 Determinación del Papel del Segundo Segmento Transmembranal de ρ1 en la Desensibilización del Receptor 33
2.6.1 Construcción de genes quiméricos por PCR y Ligación intermolecular 33
3. RESULTADOS
3.1 Clonación Molecular y Expresión Funcional de Formas Alternativas del Receptor ρ1 35
3.1.1 Tres Isoformas del Receptore ρ1 se Expresan en la Retina Humana 35
3.1.2 Expresión de ρ1Δ51 y ρ1Δ450 en Oocitos de *Xenopus* 37
3.1.3 Caracterización Farmacológica del Receptor ρ1Δ51 39
3.1.4 Distribución del Receptor ρ1 en Tejido Cerebral Bovino 41
3.1.5 Expresión de Receptores ρ1 en Fusión con GFP 42
3.2 Los Receptores $GABA_C$ se Expresan en el SNC y Forman Homo-oligómeros Funcionales al Expresarse en Oocitos de *Xenopus* 46
3.2.1 Expresión Funcional de Receptores del SNC en Oocitos y Ensayos de PCR 46
3.2.2 Los Receptores $GABA_C$ se Expresan en las Células de Purkinje y de Golgi del Cerebelo de Rata 49
3.2.3 Dos Receptores $GABA_C$ son Expresados en el Cerebelo Bovino 50
3.2.4 Un Receptor Similar a ρ3 se Expresa en Cerebro de Rata Pero no

Expresa Receptores Funcionales en Oocitos 54
3.3 Las Mutaciones en los Sitios Blanco de Fosforilación no Modifican la Tasa de Desensibilización de ρ1 56
3.3.1 Expresión de Receptores Mutantes en Oocitos de *Xenopus* 56
3.3.2 La Segunda Asa Intracelular de ρ1 no es Fosforilada *in vitro* por PKC o PKG 57
3.4 Determinación del Papel del Segundo Segmento Transmembranal de ρ1 en la Desensibilización del Receptor 60
3.4.1 Expresión de los Receptores Quiméricos en Oocitos de *Xenopus* 60
4. DISCUSION
4.1 Existen Tres Isoformas del Receptor ρ1 Humano 65
4.2 Los Receptores $GABA_C$ se Expresan en el Sistema Nervioso Central 68
4.3 Cambios en los Sitios de Fosforilación del Receptor ρ1 no Afectan su Tasa de Desensibilización 71
4.4 El Segundo Segmento Transmembranal de ρ1 no Determina la Baja Tasa de Desensibilización del Receptor 73
5. CONCLUSIONES 75
Consideraciones Finales y Perspectivas 76
Referencias 78

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Modelo de la función inhibitoria de GABA en la sinapsis neuronal.	3
Figura 2. Modelo estructural de una subunidad de receptor de la familia de receptores ionotrópicos.	5
Figura 3. Corrientes generadas por GABA en oocitos inyectados con RNAm de retina	9
Figura 4. Detección por PCR de formas alternativas del receptor ρ1 en la retina humana.	4
Figura 5. Posición de los oligonucleótidos utilizados en la PCR.	20
Figura 6. Mapa funcional del plásmido pSP64T-ρ1.	22
Figura 7. Estrategia de construcción del plásmido de expresión de la quimera ρ1-GFP	26
Figura 8. Estrategia para la expresión de la proteína fusión MBP-ρ1	32
Figura 9. Estrategia para la construcción de genes quimera	34
Figura 10. Tres isoformas del receptor ρ1 se expresan en retina humana.	36
Figura 11. Expresión funcional de ρ1Δ51 en oocitos de *Xenopus*.	38
Figura 12. Bloqueo de ρ1Δ51 por iones de zinc.	39
Figura 13. Corrientes generadas por GABA, glicina y β-alanina en oocitos inyectados con el Plásmido de expresión de ρ1Δ51	40
Figura 14 Análisis electroforético de los productos de RT-PCR de ρ1 y ρ1Δ51 obtenidos de diversas áreas del cerebro.	41
Figura 15. Caracterización funcional de ρ1-GFP.	43
Figura 16. Expresión del receptor ρ1Δ450-GFP.	44
Figura 17. Expresión funcional de RNA poliA$^+$ de cerebelo y corteza.	47
Figura 18. Tamizaje de genes similares a $GABA_C$.	48
Figura 19. Determinación de la expresión de los receptores ρ1–ρ3 por *hibridación in situ en cortes de cerebelo.*	50
Figura 20. Secuencia aminoacídica predicha a partir de la secuencia nucleotídica de los receptores bρ1 y bρ2 clonados de cerebelo bovino.	52
Figura 21. Caracterización funcional de los receptores bρ1 y bρ2 clonados a partir de cerebelo bovino.	53
Figura 22. Secuencia aminoacídica del receptor rρ3.	55
Figura 23.El receptor ρ1 mutado en los aminoácidos blanco para la proteína-cinasa C conserva las propiedades del receptor silvestre	56
Figura 24. La activación del receptor AT1 inhibe las corrientes del receptor ρ1 y de $ρ1_{(S425,434,441A)}$.	58
Figura 25. Construcción de plásmidos de expresión, inducción de	

la expresión en *E. coli*. 59
Figura 26. Ensayos de fosforilación *in vitro* de proteínas de fusión. 60
Figura 27. Caracterización funcional de la quimera ρ1/α1. 63
Figura 28. Caracterización funcional de la quimera $\rho 1_{[\alpha 1TM2]}$. 64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Algunas diferencias funcionales, estructurales y farmacológicas entre los receptores $GABA_A$ y $GABA_C$ 7

LISTA DE ABREVIATURAS

AT	angiotensina
bic	bicuculina
CMV	citomegalovirus
DNA	ácido deseoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
g	fuerza de gravedad
GABA	γ-amino butirato
GFP	proteína verde fluorescente
μ	micrometros
MBP	proteína de unión a maltosa
μl	microlitros
ml	mililitros
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PKC	proteína cinasa C
PKG	proteína cinasa dependiente de trifosfato de guanosina
RNA	ácido ribonucleico
RNAc	RNA copia
RNAm	RNA mensajero
RT-PCR	Retrotrancripción-PCR
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sodio
SNC	sistema nervioso central
TM2	región transmembranal 2
TPMPA	(1,2,5,6-Tetrahidropiridina-4-il)metilfosfonato

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al esfuerzo de todo un grupo de valiosos asesores, colaboradores y amigos, que me dieron su apoyo durante todo el tiempo en el que estuve dedicado a sacar adelante los experimentos mostrados en este trabajo.

Al Dr. Ricardo Miledi, cuya guía ha sido pieza fundamental en mi formación no solo en el ambito científico, que ha sido una experiencia excepcional, sino también en mi desarrollo personal.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña por haberme venido enseñando el oficio de la Biología Molecular desde que estudiaba la carrera de Biólogo (tiempo antes de hacer mi primer PCR).

A la comisión de tesis: Dra. Herminia G. Martínez, Dra. Agnes Revol, Dr. Julio Sepúlveda y Dr. Jorge Valenzuela.

Al Dr. Angelo Demuro, por haber realizado experimentos claves para la caracterización final de varios de los receptores construidos y clonados; sin su colaboración los objetivos planteados en este trabajo no hubiesen tenido los alcances aquí descritos.

A los Drs. Jesús García Colunga y Daniel J. Calvo por sus valiosas críticas a los experimentos.

A Joseph W. Backus, Thao D. Nguyen y Max Nguyen en orden cronológico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo en estos tres años con una beca crédito.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ataúlfo Martínez-Torres

Candidato para el grado de:

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Campo de Estudio: Biología Molecular de Neuroreceptores

Tesis: ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES DE RECEPTORES $GABA_C$

Biografía:

Datos personales: Nacido en Monterrey, N.L. el 17 de junio de 1967. Hijo de Adolfo Martínez Hernández y Graciela Torres Aranda.

Educación: Preparatoria No. 9 de la UANL. Biólogo por la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL en 1991. Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética por la Facultad de Medicina de la UANL en 1994.