CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES DE LOS RECEPTORES DEL GABA

1.1.1 Los Receptores del GABA Inhiben el Potencial Sináptico.

El ácido γ-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de todos los vertebrados, incluyendo los humanos. El papel esencial del GABA en el *sistema nervioso central es inhibir el potencial sináptico excitatorio de las neuronas* (Nicholls *et al*, 1993). Esto es, impedir que una neurona en un momento determinado sea capaz de iniciar un potencial de acción (Fig. 1). Este aminoácido es sintetizado en las neuronas a partir de la descarboxilación del L-glutamato y ejerce su acción inhibitoria actuando sobre al menos tres distintos tipos de neuroreceptores de membrana, los cuales son genética, funcional y farmacológicamente distintos. Estos receptores se agrupan en las familias $GABA_A$, $GABA_B$ y $GABA_C$ (Enna y Bowery, 1997).

Las familias $GABA_A$ y $GABA_C$ son miembros de una superfamilia génica de receptores **ionotrópicos** (es decir, receptores que en una configuración dada forman por sí mismos un canal iónico) la cual incluye receptores de otros neutransmisores, tales como los receptores de glicina y de acetilcolina (Xue 1998; Russek *et al*, 1999). Por otro lado, el receptor $GABA_B$ forma parte de la superfamilia de receptores **metabotrópicos**. Estos receptores están asociados a proteínas G y la familia abarca una gran variedad de receptores con funciones múltiples y con distribución y

exhiben diversidad funcional como consecuencia de ser codificados por dos genes y de la formación de isoformas originadas por "splicing" alternativo (Isomoto *et al*, 1998).

El GABA ejerce su función inhibitoria sobre las neuronas propiciando un ambiente más negativo en el interior celular (hiperpolarización), haciendo más difícil el inicio de un potencial de acción. Los eventos que llevan a la hiperpolarización de la neurona son similares cuando se activan los receptores $GABA_A$ o $GABA_C$ y difieren de los eventos generados por los receptores $GABA_B$.

Cuando un receptor $GABA_A$ o $GABA_C$ es activado por GABA, su estructura molecular cambia y con eso abre un canal que es permeable principalmente al ión cloro (Cl^-) (Fig. 1). La súbita entrada de este ión, con carga eléctrica negativa, hiperpolariza la neurona y en este estado, la generación de un potencial de acción se torna más difícil, de ahí el efecto inhibitorio del neurotransmisor (Nicholls *et al*, 1993).

Así, la inhibición sináptica se puede llevar a cabo rápidamente por medio de los receptores $GABA_A$ y la inhibición puede ser llevada a cabo lentamente, pero por largos períodos de tiempo, cuando los receptores $GABA_B$ son activados.

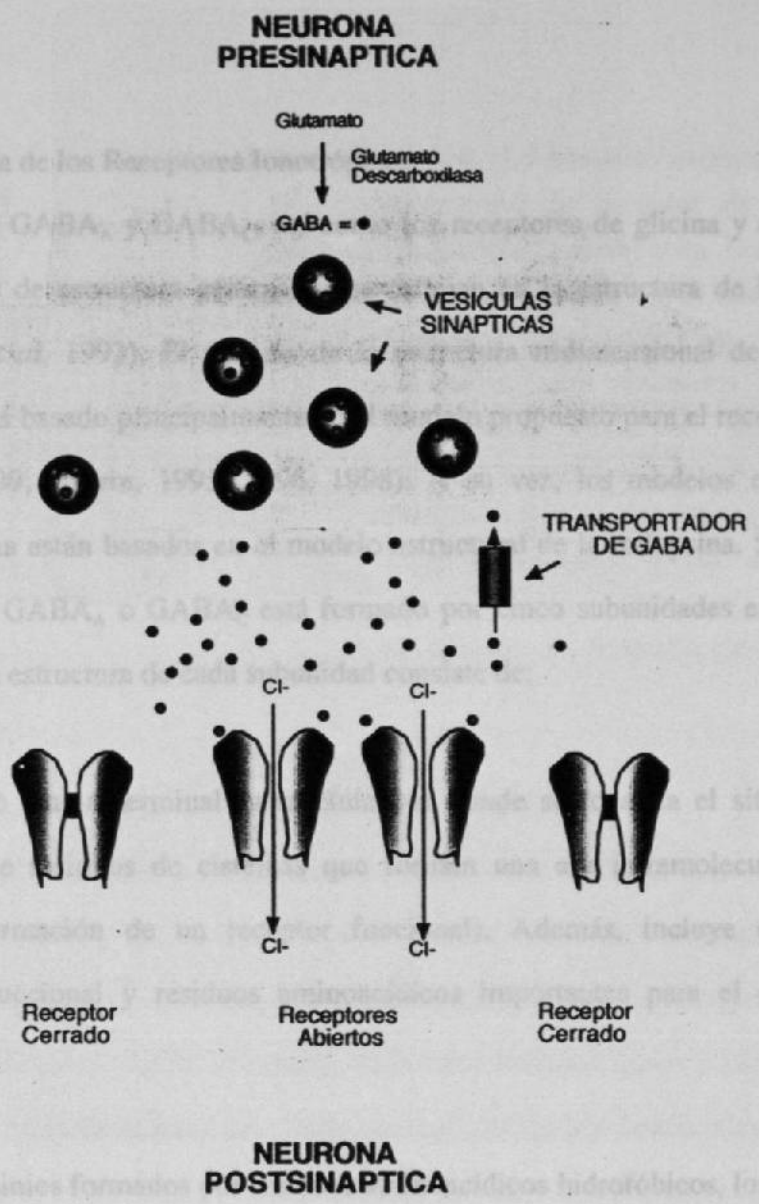

Figura 1. Modelo de la función inhibitoria de GABA en una sinapsis neuronal. El neurotransmisor GABA se sintetiza a partir de la descarboxilación del L-glutamato (que a su vez es un neurotransmisor excitatorio). Las moléculas de GABA son empaquetadas en vesículas sinápticas las cuales, con un estímulo adecuado, se fusionan a la membrana plasmática permitiendo la salida del neurotransmisor hacia el surco sináptico. El GABA se une con los receptores postsinápticos (en este caso $GABA_A$ o $GABA_C$) los cuales modifican su estructura y permiten la entrada de iones Cl^-. Esta súbita entrada propicia la hiperpolarización de la neurona, con la cual se inhibe la formación de potenciales sinápticos excitatorios y potenciales de acción. Simultáneamente, un transportador de membrana recapta el GABA y lo reintroduce al interior de la neurona presináptica.

1.1.2 Estructura de los Receptores Ionotrópicos.

Los receptores $GABA_A$ y $GABA_C$, así como los receptores de glicina y de acetilcolina, comparten similitudes de estructura génica que se reflejan en la estructura de la proteína que producen (Nicholls *et al*, 1993). El modelo de la estructura tridimensional de los receptores $GABA_A$ y $GABA_C$ está basado principalmente en el modelo propuesto para el receptor nicotínico (Miyazawa *et al*, 1999; Unwin, 1995, 1996, 1998). A su vez, los modelos estructurales de proteínas de membrana están basados en el modelo estructural de la rodopsina. Siguiendo estos modelos, un receptor $GABA_A$ o $GABA_C$ está formado por cinco subunidades embebidas en la membrana celular y la estructura de cada subunidad consiste de:

1) un dominio amino terminal extracelular en donde se localiza el sitio de unión al agonista, y un par de residuos de cisteínas que forman una asa intramolecular (la cual es necesaria para la formación de un receptor funcional). Además, incluye otros sitios de modificación postraduccional y residuos aminoacídicos importantes para el ensamblaje del receptor.

2) Cuatro dominios formados por residuos aminoacídicos hidrofóbicos, los cuales forman regiones que están integradas en la membrana celular. El segundo dominio transmembranal es de importancia primordial ya que de acuerdo a este modelo, esta región forma la pared del canal iónico.

3) Dos asas intracelulares. Una de ellas conecta al primer y segundo segmentos transmembranales y la segunda al tercer y cuarto dominios transmembranales. La segunda asa contiene señales de modificación postraduccional y entre éstas se encuentran señales para la fosforilación por la enzima proteína-cinasa C (Fig. 2).

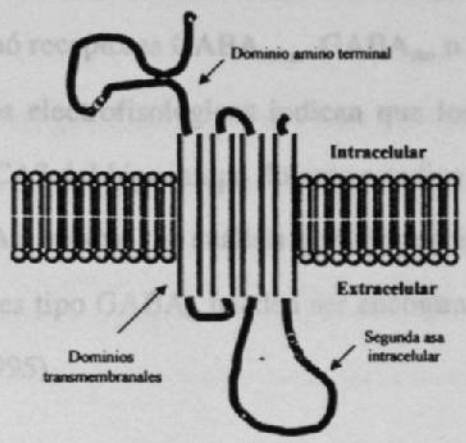

Figura 2. Modelo estructural de una subunidad de receptor de la familia de receptores ionotrópicos. Los receptores de la familia de receptores ionotrópicos están formados por cinco subunidades. Cada subunidad tiene dominios evolutivamente conservados como: el dominio amino-terminal extracelular, donde se encuentra el sitio de unión al agonista; cuatro dominios transmembranales; y un asa intracelular grande con residuos sujetos a modificaciones postraduccionales.

1.2 CARACTERISTICAS DE LOS RECEPTORES $GABA_C$.

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

Previo a la clonación de los genes que codifican para los receptores $GABA_C$, las caracteristicas de estos receptores fueron estudiadas utilizando diversas metodologías: 1) al inyectar el RNAm extraído de retina en oocitos de la rana *Xenopus laevis* y caracterizando los receptores producidos en la membrana del oocito electrofisiológica y funcionalmente (Polenzani *et al*, 1991; Woodward *et al*, 1992a,b,c, 1993). Después de estos reportes, 2) se determinó en qué regiones del SNC y en qué tipos celulares de la retina son expresados, utilizando hibridación *in situ* e inmunocitoquímica (Enz *et al*, 1996; Koulen *et al*, 1997a,b; Salceda *et al*, 1993), y 3) mediante el registro electrofisiológico directo en células de la retina, tales como las células horizontales del cono de la rata, las células del ganglio retinal de la tortuga, las células amacrinas y ganglionares de la salamandra, y en las células horizontales de los bastones de rata y percha (Dong y Werblin, 1995; Liu y Lasater, 1995; Luckasiewicz *et al*, 1994; Luckasiewicz y Wong 1997; Luckasiewicz y Shields, 1998; Nelson *et al*, 1999; Qian y Dowling, 1993, 1994, 1995; Yeh *et al*, 1996).

Puesto que inicialmente estos receptores se descubrieron en la retina de mamíferos se les denominó receptores $GABA_{retina}$, $GABA_{rho}$ o GABAρ (Polenzani *et al*, 1991). Sin embargo, otros hallazgos electrofisológicos indican que los receptores $GABA_C$ pueden estar presentes en las células CA3 del hipocampo durante estadios tempranos del desarrollo murino (Strata y Cherubini 1994). Así mismo, el análisis por hibridación de RNA en filtros ('Northen blots') sugiere que receptores tipo $GABA_C$ pueden ser encontrados en cerebelo e hipocampo de mamíferos (O'Hara *et al*, 1995).

1.2.2 Existen al Menos Tres Tipos de Subunidades de Receptores $GABA_C$.

Como se mencionó anteriormente, hasta ahora se han clonado tres diferentes genes que pertenecen a la familia $GABA_C$ y se les ha denominado ρ1, ρ2 y ρ3 (Cutting *et al*, 1991, 1992; Ogorusu *et al*, 1997; Qian *et al*, 1997, 1998; Shingai *et al*, 1996; Wang *et al*, 1994). Todos ellos son expresados abundantemente en la retina y preservan las características anteriormente mencionadas que los distinguen como receptores $GABA_C$. Cada uno de ellos comparte entre un 70 y un 77% de similitud en su secuencia aminoacídica y alrededor de un 30 al 35% de similitud con los miembros de los receptores $GABA_A$ y receptores a glicina.

Las tres subunidades (ρ1, ρ2 y ρ3) del receptor $GABA_C$ son capaces de formar receptores funcionales cuando son expresados en sistemas heterólogos (oocitos de *Xenopus* o células en cultivo), sin requerir de ninguna subunidad accesoria (Calvo *et al*, 1994; Cutting *et al*, 1991, 1992; Kusama *et al*, 1993a,b; Ogorusu *et al*, 1996, Shimada *et al*, 1993; Wang *et al*, 1994). Sin embargo, algunos reportes indican que la subunidad ρ2 de rata no forma receptores *homo-oligoméricos* funcionales y requiere la cooperación de la subunidad ρ1 para ensamblar un receptor funcional (Zhang *et al*, 1997). Esto contrasta con las características de las subunidades ρ2 de humanos y peces, las cuales forman homo-oligómeros funcionales (Cutting et al 1992,

Qian y Dowling, 1997, 1998). Por tanto, se necesitarán estudios más detallados para apoyar o descartar la noción de que la subunidad ρ2 de rata no es funcional.

Los genes ρ1 y ρ2 han sido ubicados en la región q21-23 del cromosoma 6 humano y forman un agrupamiento de genes organizados en tandem (Cutting *et al*, 1992). Es interesante señalar que en esta misma región se localiza un locus asociado a la retinitis pigmentosa del tipo autosómica recesiva (Ruiz *et al*, 1998); sin embargo, aún no se define si existe una relación entre la enfermedad y mutaciones o alteraciones en la expresión de los receptores ρ.

El arreglo en tandem de los genes de las subunidades ρ concuerda con la evolución del arreglo multigénico de los genes $GABA_A$, ya que éstos se disponen en varios loci en paquetes de tres a cinco genes incluyendo algunos que codifican para diferentes subunidades α, β y γ, y los cuales están distribuídos en varios cromosomas (Bailey *et al*, 1999; Glatt *et al*, 1997; Greger *et al*, 1995; Kosterzewa *et al*, 1996; Russek *et al*, 1994; Sinnett *et al*, 1993).

Tabla 1

Algunas diferencias funcionales, estructurales y farmacológicas entre los receptores $GABA_A$ y $GABA_C$

	$GABA_A$	**$GABA_C$**
Subunidades del receptor	α1–6, β1–4, γ1–4, δ ε/χ	ρ1, ρ2, ρ3
Tipo de asociación	Hetro-oligómero	Homo-oligómero*1
Desensibilización	Rápida	Lenta o nula
Resistencia a bicuculina	No	Si
Distribución en el SNC	Abundante	Principalmente en retina*2

*1. La subunidad ρ2 de rata tiene una mutación en su extremo amino-terminal, lo que aparentemente impide formar homo-oligómeros funcionales. Sin embargo, las subunidades ρ2 de humano y peces si son funcionales.

*2 Recientemente se encontró que el RNAm de ρ2 es expresado en bajas cantidades en el cerebro humano. En el presente trabajo se presentaran pruebas de que otras subunidades $GABA_C$ son expresadas en el cerebelo de mamífero.

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

Existen muy claras diferencias estructurales entre los receptores $GABA_A$ y $GABA_C$, pese a que ambos son miembros de una misma familia génica y que responden al mismo neurotransmisor. Por una parte, los receptores $GABA_C$ son *homo-oligómeros* es decir, están formados por cinco subunidades idénticas. Estas subunidades son el producto de la expresión de tres genes y se les denomina ρ1, ρ2 y ρ3. (Amin y Weiss, 1994; Calvo *et al*, 1994; Calvo y Miledi, 1995; Cutting *et al*, 1991). En contraste, los receptores $GABA_A$ *son hetero-oligómeros* que para ser funcionales requieren el acoplamiento de al menos dos tipos de subunidades (α y β), siendo además necesario el ensamblaje de otras subunidades accesorias (γ, δ, η) para adquirir todas las características farmacológicas y electrofisológicas propias de los receptores $GABA_A$ presentes en las neuronas (Connolly *et al*, 1996; Fritschy *et al*, 1997; Prichett *et al*, 1988).

Otra característica que distingue a las dos clases de receptores radica en las diferencias funcionales de sus mecanismos de desensibilización. Por ejemplo, cuando los receptores $GABA_A$ se activan permiten la entrada de Cl^- al interior de la célula y después de unos cuantos segundos de activación, el receptor inicia un declive en la amplitud de la corriente generada, pese a la presencia continua del agonista (Polenzani *et al*, 1991; Celentano y Wong 1994; Cash y Subbarao 1988; Tia *et al*, 1996) (Fig. 3). Aún más, si el agonista se aplica repetidamente las respuestas subsecuentes disminuyen en su amplitud. En cambio, en los receptores $GABA_C$ estos efectos no suceden así (Polenzani *et al*, 1991; Woodward *et al*, 1992a,b,c 1993). La presencia del agonista, aún después de diez minutos o más de exposición, hace que disminuya la respuesta en apenas un 8-10% y aplicaciones repetidas del agonista no llevan a una disminución de las respuestas subsecuentes. Es decir los receptores $GABA_C$ prácticamente no se desensibilizan.

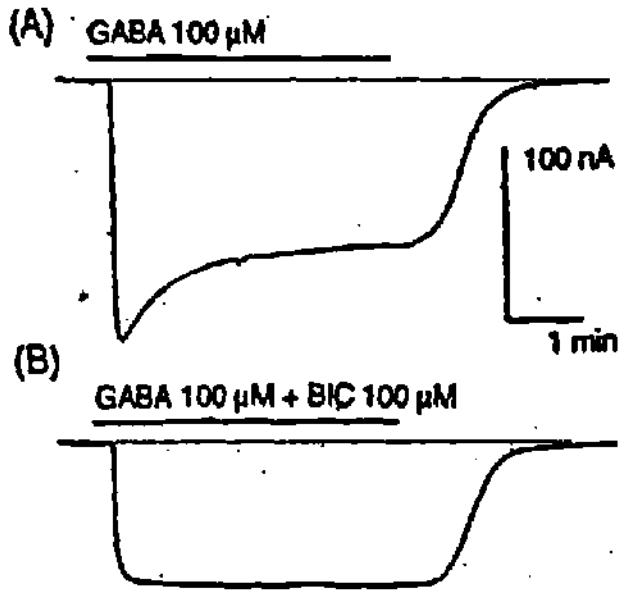

Figura 3. Corrientes generadas por GABA en oocitos inyectados con RNAm de retina. Las respuestas a GABA en estos oocitos son mixtas, ya que expresan ambos tipos de receptores. A) Corriente generada por GABA a 100 µM; la cual muestra tanto el componente de $GABA_A$ como el $GABA_C$ (el cual no desensibiliza) y que además, como se muestra en B) no es bloqueado por bicuculina, antagonista específico de los receptores $GABA_A$ (Tomado de Polenzani *et al*, 1991).

Las diferencias que existen entre las secuencias aminoacídicas de ambas clases de receptores resultan en divergencias de sus características farmacológicas. Por ejemplo, clásicamente los receptores $GABA_A$ se distinguen porque son antagonizados por el alcaloide bicuculina (Johnston 1972), mientras que los receptores $GABA_C$ no son afectados por este alcaloide (Polenzani *et al*, 1991). Por otra parte, las benzodiazepinas (que son moléculas ampliamente utilizadas en la clínica como antidepresivos y relajantes), tienen un efecto directo sobre los receptores $GABA_A$, modulándolos de tal modo que incrementan su acción inhibitoria al favorecer una mayor hiperpolarización neuronal (Costa y Guidotti, 1996). Estas benzodiazepinas no tienen efecto alguno sobre los receptores $GABA_C$ (Woodward *et al*, 1993), a excepción de algunas circunstancias especiales (Calvo y Miledi, 1998).

Por otra parte, en células HEK293 transfectadas con plásmidos de expresión transitorios del receptor $GABA_A(\alpha 2\beta 1)$ o de la subunidad ρ1, el agente hipnótico-sedativo 2,2,2-

tricloroetanol tiene acciones opuestas sobre los receptores formados. Por un lado, incrementa las corrientes generadas por el receptor $GABA_A(\alpha2\beta1)$, mientras que a las mismas concentraciones no modifica las corrientes de ρ1, aunque lo inhibe a altas (Krasowski *et al*, 1998).

El detergente Bio-Soft-62, el cual es un sulfonado lineal alkil bencénico también tiene efectos opuestos sobre los receptores $GABA_A$ y ρ1 cuando éstos son expresados en oocitos de *Xenopus*. Por ejemplo, a una concentración entre el 0.0001 y el 0.01% incrementa las corrientes generadas por los receptores $GABA_{A(\alpha1\beta2)}$ y $GABA_{A(\alpha1,\beta2,\gamma2L)}$, entre un 21 a un 458%. Por otra parte, el receptor formado por ρ1 es inhibido aproximadamente un 72% a una concentración del detergente del 0.001% (Machu *et al*, 1998).

1.2.4 Formas Alternativas de los Receptores $GABA_A$.

El potencial codificante de los genes eucarióticos se incrementa mediante mecanismos postranscripcionales como la remoción alterna de intrones ('splicing' alternativo), la selección de promotores, sitios de poliadenilación alternativos y por la edición del RNAm (Singer y Berg 1991). Los eventos de "splicing" son particularmente complejos en el SNC y son comunes en algunos genes de neuroreceptores, donde la remoción diferencial de intrones produce subunidades que confieren propiedades diferentes al receptor (Ashiya y Grabowski, 1997, Lopez, 1998, Wang y Grabowski, 1996, Zhang *et al*, 1999). Particularmente, los genes de las subunidades α5, α6, β2, β3 y γ2 de los receptores $GABA_A$, aumentan su potencial codificante al remover intrones en forma alternativa (Huntsman *et al*, 1998; Jones *et al*, 1996; Liu *et al*, 1998; McKinley *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1996). Este mecanismo también ocurre en algunos genes de receptores ionotrópicos de invertebrados (Bamber *et al*, 1999; Hosie y Satelle 1996). También miembros de las familias génicas de receptores nicotínicos (Mileo *et al* 1995), NMDA (Luque *et al* 1994) y glutamato (Hampson *et al* 1994) producen formas alternativas a partir de un solo gen, lo que complementa la diversidad de receptores debida a la existencia de familias multigénicas para incrementar la complejidad del SNC.

Estudios iniciales desarrollados por R. Miledi y A. Vázquez sugerían que en bancos de DNAc de retina humana existirían dos isoformas menores de la subunidad ρ1, las cuales aparentemente eran formadas por eventos de "splicing" alternativo. La figura 4 muestra un experimento donde se utilizó PCR para tamizar una biblioteca de DNAc de retina humana en busca de secuencias semejantes a ρ1. Como se puede apreciar en esta figura, la presencia de diferentes fragmentos indican que potencialmente el gen ρ1 podría derivar al menos tres transcritos, sin embargo la evidencia no era lo suficientemente fuerte por carcer de la secuencia nucleotídica de éstos y de clonas derivadas de bancos de genes. Como se mostrará mas adelante, en este trabajo se abordó la clonación molecular, determinación de la secuencia nucleotídica y expresión funcional de estas supuestas isoformas.

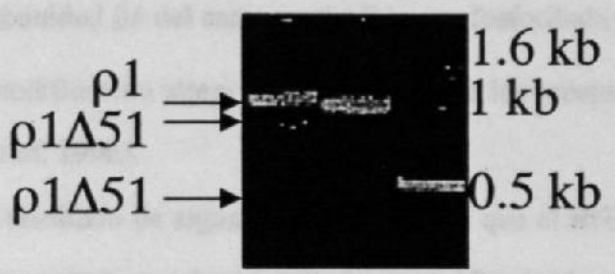

Figura 4. Detección por PCR de formas alternativas del receptor ρ1 en la retina humana. El análisis inicial de una biblioteca de DNAc de retina mostró tres productos de amplificación de PCR. Estos tres productos fueron resueltos electroforéticamente y como se distingue en esta fotografía corresponden a: **1)** ρ1, **2)** la nueva forma ρ1Δ51 y **3)** a una tercera forma que se denominó ρ1Δ450.

1.3 MECANISMOS DE DESENSIBILIZACION DE RECEPTORES IONOTROPICOS

1.3.1 Papel de la Fosforilación en la Desensibilización de Receptores Ionotrópicos.

Recientemente, muchos estudios sobre la regulación funcional de neuroreceptores se han enfocado sobre el papel que juegan las enzimas de modificación postraduccional, tales como las cinasas (Lin *et al*, 1996; McDonald y Moss 1994; Moss *et al*, 1992a,b; Swope *et al*, 1992). Esta familia de enzimas transfiere grupos fosforilo a partir de ATP hacia una gran diversidad de proteínas blanco. La familia de las proteín-cinasas abarca alrededor de cien diferentes proteínas con características particulares individuales (Pearson y Kemp 1991). Tres de estas proteínas, la proteína-cinasa C (PKC), proteína-cinasa A (PKA) y proteína-cinasa G (PKG), fosforilan neuroreceptores ionotrópicos. Por ejemplo, la subunidad β1 del receptor $GABA_A$ es fosforilada en la región intracelular por PKC, y esta modificación altera las propiedades de los receptores ensamblados formados por β1 (Lin *et al*, 1996).

Como resultado de algunos estudios en los que el RNAm de retina bovina fueron expresados en oocitos, se obtuvo una fuerte evidencia de que la desensibilización del receptor ρ1 puede ser modificada por el estado de fosforilación en el que se encuentra en el oocito. A menudo, cuando los receptores $GABA_C$ son activados 5-10 veces sucesivas, la magnitud de las repuestas crece progresivamente. Si en el mismo oocito se activa un receptor que este acoplado a proteínas G, como por ejemplo el receptor endógeno a suero (Tigyi *et al*, 1990), esto inicia una serie de reacciones que involucran la activación y desactivación simultánea de una gran variedad de proteín-cinasas y fosfatasas. Toda esta cascada de eventos modifica la magnitud de las corrientes generadas por el receptor $GABA_C$ de retina y muy posiblemente involucra la modificación de su estado de fosforilación.

Además, existe evidencia de que algunos receptores del tipo $GABA_A$ modifican su tasa de desensibilización cuando son fosforilados (Leidenheimer *et al*, 1992; Lin *et al*, 1996; Moss *et al*, 1992a,b). Con el fin de saber si los receptores $GABA_C$, formados exclusivamente de la subunidad ρ1, son modificados por proteína-cinasas, se utilizó un programa de computación que permitió identificar siete residuos que llenan el consenso para ser fosforilados por la PKC y existe la posibilidad de que estos puedan estar involucrados en la desensibilización del receptor. El tema de la potencial fosforilación del receptor ρ1 se abrodará con más detalle en subsecuentes capítulos.

1.3.2 Elementos Estructurales del Receptor y su Papel en la Desensibilización.

Los tres miembros de la familia de receptores $GABA_C$ se caracterizan por presentar una baja tasa de desensibilización (Polenzani *et al*, 1991), y esta propiedad es compartida por las respuestas electrofisiológicas a GABA registradas, ya sea directamente en la retina de diversas especies de vertebrados ó en oocitos de *Xenopus* inyectados con RNAm de retina bovina (Enz y Cutting 1998; Johnston *et al*, 1996; Polenzani *et al*, 1991). La excepción a esta característica son los registros electrofisiológicos de células bipolares de la retina de la carpa, en los cuales pese a que las corrientes no son bloqueadas por bicuculina (característica tipica de los receptores $GABA_C$), éstas decaen como las de los receptores tipo $GABA_A$ (Han *et al*, 1997). Sin embargo, el hecho de que todos los receptores $GABA_C$ conservan la propiedad de no desensibilización a lo largo de la escala filogenética, así como entre los diferentes miembros de la familia génica, indica que esta característica debe jugar un papel fisiológico muy importante para este receptor y por ende para las funciones de la retina y del cerebro.

Algunas mutaciones puntuales del canal iónico de algunos receptores son capaces de alterar la cinética de los receptores ionotrópicos, mediante cambios en la tasa de

Algunas mutaciones puntuales del canal iónico de algunos receptores son capaces de alterar la cinética de los receptores ionotrópicos, mediante cambios en la tasa de desensibilización. Este tipo de cambios fueron encontrados inicialmente en la subunidad α7 del receptor nicotínico (Revah *et al*, 1991) y recientemente en la subunidad α6 del receptor $GABA_A$ (Im *et al*, 1995). En ambos casos, residuos de leucina que son conservados filogenéticamente en este dominio fueron modificados por mutaciones *in vitro* y estos cambios alteraron la cinética de desensibilización de los receptores.

1.4 EL OOCITO DE *Xenopus laevis* COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR NEURORECEPTORES Y CANALES IONICOS.

1.4.1 Generalidades del Oocito de *Xenopus laevis*.

Los oocitos de *Xenopus* que son utilizados para la caracterización funcional de canales iónicos y neuroreceptores son células inmaduras cuyo ciclo celular está interrumpido en la profase meiótica 1 (Dumont 1972). El desarrollo de estos oocitos se dividen en varios estadios (I-VI) y los que generalmente son empleados para estudios electrofisiológicos se encuentran en los estados V y VI. Estos oocitos miden aproximadamente entre 1 y 1.5 mm de diámetro y están divididos en dos hemisferios: el vegetal que es de coloración amarillenta y el animal que es oscuro y es hacia donde se localiza el núcleo o vesícula germinal.

Los oocitos se pueden aislar fácilmente del ovario usando pinzas de punta fina. Una vez separados, éstos se encuentran rodeados por cubiertas de células (foliculares y epiteliales) y otras fibras de soporte (cubierta vitelina) y tejido conectivo (teca). Estas cubiertas protegen al oocito de daño mecánico y aportan diversos factores para su desarrollo (Dumont 1972, Miledi *et al*, 1989).

1.4.2 Los Oocitos de *Xenopus* Traducen RNAm Heterólogo.

Cuando los oocitos son inyectados con RNAms, proveniente de otro tejido o tipo celular (por ejemplo del cerbro o retina), la maquinaria traduccional del oocito reconoce a los mensajeros exógenos y sintetiza las proteínas codificadas en éstos. De este modo, los RNAms inyectados codifican para las proteínas sintetizadas en el tejido del cual se extrajo originalmente, entre estas proteínas estarán los canales ionicos y receptores, los cuales, al ser insertados en la membrana del oocito pueden ser fácilmente estudiados por métodos electrofisiológicos (Gundersen *et al*, 1983a,b; Gundersen *et al*, 1984a,b,c; Sumikawa *et al*, 1984). De este modo, una gran parte, o todo el arsenal de proteínas sintetizadas en un tipo celular o tejido, como por ejemplo neuronas y areas específicas del cerebro, puede ser 'transplantado' al oocito y estudiado en esta célula que es fácil de manipular, accesible y bastante resistente al daño mecánico comparado con neuronas independientes mantenidas en cultivo.

1.5 JUSTIFICACION

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central y el estudio de sus receptores contribuirá a entender mejor los principios normales y patológicos de la transmisión sináptica que ocurre en el cerebro y en la retina. Ello dará una mejor panorámica de las características moleculares y funcionales de la transmisión sináptica, la cual es la base de las funciones del cerebro.

1.6 OBJETIVO GENERAL

Estudiar algunas de las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores $GABA_C$ y de las isoformas de su subunidad ρ1.

1.7 OBJETIVOS PARTICULARES

I. Aislar a partir de bancos de DNAc de retinas humanas los DNAcs de las supuestas isoformas de la subunidad **GABAρ1** y determinar su secuencia nucleotídica.

II. Analizar las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de las isoformas de **GABAρ1** en el modelo de los oocitos de *Xenopus laevis*.

III. Determinar la distribución de las subunidades de los receptores $\mathbf{GABA_C}$ y de sus isoformas en el SNC.

IV. Determinar si la **fosforilación** del receptor GABAρ1 por la proteína-cinasa C (PKC) está involucrada en la baja tasa de desensibilización del receptor.

V. Determinar el posible papel del **segundo dominio transmembranal** en el mecanismo de no desensibilización.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 Origen de los reactivos

Los estuches para transcripción *in vitro* fueron adquiridos de Promega (Madison, WI, EUA); el estuche para el radiomarcaje de sondas de DNA de Gibco-BRL (Rockville, MD, EUA); el estuche para la síntesis de sondas biotiniladas y detección de hibridaciones *in situ* de Boehringer (Indianapolis, IN, EUA); el estuche para la construcción de bibliotecas de DNAc en el bacteriófago λ-ZAP de Stratagene (La Jolla, CA, EUA); el estuche para la construcción y aislamiento de proteínas en fusión con el plásmido pMAL-c2 de New England Biolobas (Bethesda, MD EUA); el estuche para reacciones de RT-PCR de Boehringer; para la determinación de la secuencia nucleotídica por el método de Sanger se utilzó el estuche de USB/Amersham.

Las enzimas Taq polimersa, fosfatasa alcalina, DNA polimerasa (fragmento de Klenow) y enzimas de restricción fueron adquiridas de Gibco, BRL; la enzima Pfu de Stratagene.

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR fueron sintetizados por la compañía Genosys (San Francisco, CA, EUA).

Todo el material de plástico y vidrio (tubos, pipetas, puntas para pipeta, etc. se adquirieron de la casa comercial Falcon (distribuidor en Irvine, CA).

2.2 MATERIAL BIOLOGICO Y EQUIPO.

Material biológico. Las cépas de *E coli* se adquirieron de las siguientes compañías: DH5α (Gibco, BRL), XL1blue (Stratagene), K802 (ATCC), TB1 (New England Biolabs).

Las ranas del género *Xenopus* se adquirieron de Nasco (Madison, WI, EUA) y *Xenopus* 1 (Dexter, MI, EUA).

Las ratas empleadas para la hibridación *in situ* y para la colección de tejido para aislamiento de RNA se adquirieron de Charlie River Co. (Boston, MA).

El tejido de cerebro y retinas de bovino se obtuvo del rastro Shamrock Co. (Downey, CA, EUA).

Equipo. Se utilzó la centrifugó de alta capacidad Bckman J221 (Fullerton, CA) con el rotor TJ14. La microcentrífuga Eppendorf 5402 (Hamburgo, Alemania). Cámaras de electroforesis para minigeles horizontales, geles verticales en placa y para secuenciación de DNA de Gibco. Termociclador Perkin-Elmer 9000. Se utilizó un microscopio confocal diseñado y construído por el Dr. Ian Parker (Universidad de California, Irvine). Equipo de trampa de voltaje de Axoclamp (New Port Beach, CA) y una computadora PC para adquisición de datos.

2.3 CLONACION Y ETUDIOS FUNCIONALES Y DE DISTRIBUCION DE FORMAS ALTERNATIVAS DE LA SUBUNIDAD ρ1.

2.3.1 Tamizaje de Bibliotecas de DNAc de Retina.

Dos bibliotecas de DNAc de retinas humanas adultas y fetales construídas en el fago λgt11 y en el charon BS^+ (Swaroop y Waissmann, 1988) fueron donadas por A. Swaroop y J. Nathans (Johns Hopkins University). Se adquirió la cepa de *E coli* (K802) de ATCC (Rockville, MD, EUA), la cual se utilizó para propagar estas bibliotecas.

Depués de dos tamizajes donde se utilizaron métodos convencionales de propagación e hibridación con sondas de DNA homólogo (Sambrook *et al*, 1989), y en los que no se obtuvieron clonas positivas (muy posiblemente debido a la baja cantidad de transcritos para estos receptores), se decidió emplear una estrategia alterna que perimitiera enriquecer la cantidad de clonas menos abundantes mediante la construcción de sub-bibliotecas, y el tamizaje de éstas por PCR (Lardelli y Lendahl 1994).

2.3.2 *Propagación de la Biblioteca de DNAc y Transformación de Bacterias.*

Se propagó *E. coli* K802 en placas de LB-Agar suplementado con 0.2% maltosa y se incubó a 37°C por 14-16 h. Una sola colonia de esta placa se transfirió a un matraz con 20 ml de medio NZCYM (1g de NZ-amina, 1 g de casa-aminoacidos, 1 g de extracto de levadura y 1 g de $MgSO_4.7H_2O$ en 100 ml de H_20) suplementado con 0.2% de maltosa, se incubó a 37°C con agitación continua (230 rpm) por 12-14 h. La absorbancia óptica del cultivo se determinó a λ 600 nm y se ajustó con NZCYM suplementado con 0.2% de maltosa para obtener 20 ml de bacterias a una concentración de 0.4 unidades ópticas (a una λ de 600 nm).

Una vez ajustada la concentración, se infectó el inóculo de bacterias con 1 millón de unidades formadoras de placa (ufp) de una de las bibliotecas de DNAc. Se incubó a 37°C por 15 min y se dividió inmediatamente en 20 tubos (Falcon de 15 ml) cada uno con 1 ml del inóculo original. Estos se incubaron a 37°C por 3 h y el crecimiento se detuvo al agregar 3-4 gotas de cloroformo. Se centrifugó cada tubo a 9800 g en un rotor de angulo fijo (TJ14) por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes (los cuales contenían las partículas virales) se transfirieron a tubos nuevos y se guardaron a 4°C. La eficiencia de transformación de estos sobrenadantes bajó considerablemente después de 2-3 semanas, pese a que después de este tiempo las señales obtenidas por PCR se mantuvieron. Esta eficiencia fluctuó originalmente entre un rango de 4 a 8 $X10^9$ ufp/μl.

2.3.3. Tamizaje Molecular.

De cada sobrenadante se obtuvieron 2 µl que sirvieron como templado para realizar veinte reacciones de PCR. Se realizaron dos series de reacciones utilizando cuatro diferentes oligonucleótidos (Fig. 5). La primer reacción fué dirigida a amplificar la región del amino terminal del DNAc que codifica para ρ1 y empló a los oligonucleótidos 1=5'-ATGAGATTTGGCATCTTTCTT-3' y 2= 5'-GGCAGGGCC TCCGAAGCCAGG-3', mientras que la segunda reacción se centró en el extremo que codifica para el carboxilo terminal del receptor empleando los oligonucleótidos 3= 5'-GTGTTCCTCTCGGTGCTG3'- y 4= 5'-GGAGAAAAT AGACCAGTATAT-3', para ambas PCRs se utilizó el siguiente programa: 94°C 3 min, 35 ciclos de 94°C 40 s, 50°C 40 s y 72°C 40 s.

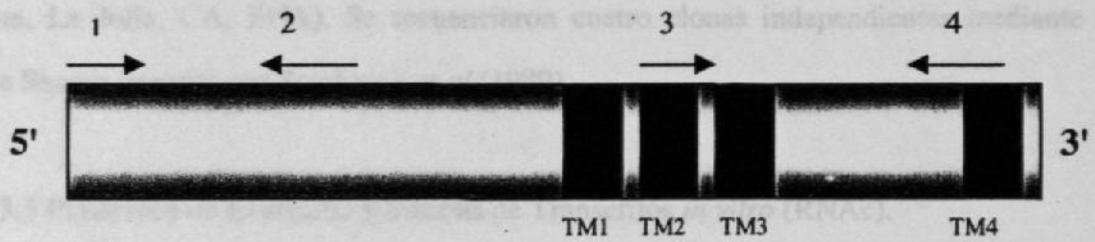

Figura 5. Posición de los oligonucleótidos utilizados en la PCR. "Primers" 1 y 2 amplifican un fragmento de 247 pb mientras que 3 y 4 amplifican 100 pb. La posición de los cuatro segmentos transmembranasles es señalada como TM1-TM4.

2.3.4. Re-propagación.

Los sobrenadantes que dieron señales positivas por PCR se utilizaron para infectar con $5X10^4$ ufp a la cepa de *E. coli* K802 y sembrar las bacterias infectadas en dos placas. Se incubó por 5-8 h ó hasta que las placas de lisis pudieran distinguirse claramente, pero sin que alcanzaran a fusionarse. Las placas se incubaron a 4°C por no menos de dos h. Cada placa se transfirió a

filtros de nylon y las clonas positivas se identificaron por hibridación homóloga en amortiguador de hibridación (Formamida 50%, 5X SSPE, 1X solution de Denhardt, SDS 0.1%) y con lavados en condiciones de alta exigencia (dos lavados de 15 min con SSC5X y SDS 0.5% a temperatura ambiente, dos lavados de 15 min con SSC 1X y SDS 0.5% a 37 ^{o}C y finalmete tres lavados con 0.1X SSC y 1% SDS a 65°C). Como sonda se utilizó el DNAc de ρ1 radiomarcado (con ^{32}P). De estos tamizajes se obtuvieron clonas correspondientes a ρ1, ρ1Δ51 y ρ1Δ450.

Cada clona positiva se propagó independientemente en 50 ml de LB suplementado con 0.2% de maltosa y se extrajo el DNA de cada una (Sambrook *et al*, 1989). Este DNA se cortó con *Eco*R1 para liberar el fragmento correspondiente al DNAc. Debido a que el DNAc de ρ1 contiene un sitio *Eco*R1 interno, fué necesario realizar un corte parcial. La banda de peso molecular aproximado a 2 Kb se aisló y se subclonó en el sitio *Eco*R1 del plásmido pBSKS (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Se secuenciaron cuatro clonas independientes mediante el método de Sanger descrito por Sambrook *et al* (1989).

2.3.5 Plásmidos de Expresión y Síntesis de Transcritos *in vitro* (RNAc).

10 μg de cada clona seleccionada en pBSKS fueron linearizados con la enzima de restricción *Sal*I para la producción de un RNAc con sentido y con *Not*I para la producción del antisentido. Los plásmidos linearizados se "limpiaron" mediante dos extracciones con fenol-cloroformo, se precipitaron con acetato de amonio 7.5 M y etanol absoluto y se centrifugaron por 30 min, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y finalmente se secó en un evaporador centrífugo con vacío.

Para la síntesis de RNAc (la cual se realizó con todos los componentes libres de RNAsas), el plásmido linearizado se resuspendió en agua y los componentes fueron agregados en

el siguiente orden: rNTPs (concentración final de 10 mM), DTT 100 mM, CAP (7-metil guanosina) (0.3 mM final) y 5U de la enzima RNA polimerasa de T7 (sentido) o la RNA polimerasa de T3 (antisentido).

Como una alternativa, para incrementar los niveles de expresión de los receptores, se transfirieron los DNAcs de ρ1, ρ1Δ51 y ρ1Δ450 al plásmido pSP64T (Krieg y Melton 1984), linearizado con *Bgl*II, "rellenado" en los extremos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* y desfosforilado con la fosfatasa alcalina de intestino de ternera. Para producir el RNAc, el plásmido fue linearizado con *Sal*I y el transcrito producido con la RNA polimerasa de SP6 (Fig. 6).

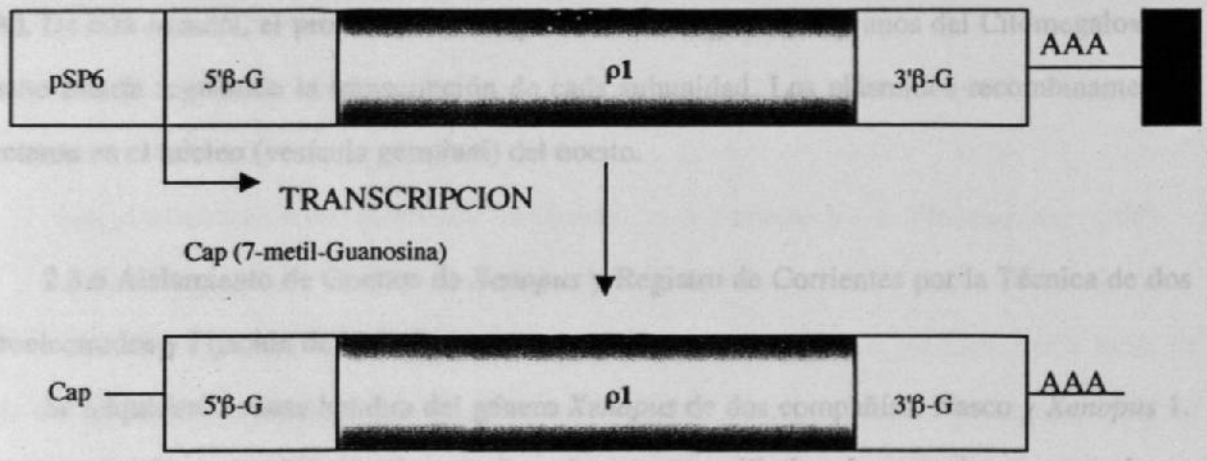

Figura 6. Mapa funcional del plásmido pSP64T-ρ1. El DNAc de ρ1 fue insertado en el sitio *Bgl*II del plásmido pSP64T (Krieg y Melton, 1984), de tal manera que la transcripción está regulada por el promotor del fago SP6. En los extremos 5' y 3' de la región codificante para el receptor, se localizan las regiones no traducibles del gen de la β-globina (β-G) de *Xenopus* y en el extremo distal 3' se localiza una secuencia de poliadeninas. El nucleótido metilado (7 metil-Guanosina) que forma el "capuchón" (Cap) del transcrito es añadido por la RNA polimerasa durante la reacción de transcripción *in vitro*.

Después de 3 h de incubación a 37°C el DNA plasmídico se eliminó con 1 U de DNAsa (RQ1) (Promega, Madison, WI, EUA) por 15 min a 37°C. La solución se limpió con un volumen de fenol-cloroformo y el sobrenadante, que contiene el RNAc, se precipitó con acetato de amonio y etanol, se centrifugó por 30 min y finalmente se lavó con 1 ml de etanol al 70%. La pastilla final se secó al vacío y se resuspendió en 10 μl de agua estéril y libre de RNAsa. El RNAc se cuantificó en el espectrofotómetro y se ajustó a una concentración de 1 μg/μl. Este RNAc se conservó congelado a -70°C hasta su uso.

En una tercer alternativa de expresión, se subclonaron los DNAcs de ρ1, ρ1Δ51 y ρ1Δ450 en el plásmido de expresión eucariótica pcDNA3 (Invitrogen, La Jolla, CA, EUA). De esta manera, el promotor transcripcional de los genes tempranos del Citomegalovirus humano estaría regulando la transcripción de cada subunidad. Los plásmidos recombinantes se inyectaron en el núcleo (vesícula germinal) del oocito.

2.3.6 Aislamiento de Oocitos de *Xenopus* y Registro de Corrientes por la Técnica de dos Microelectrodos y Fijación de Voltaje.

Se adquirieron ranas hembra del género *Xenopus* de dos compañías: Nasco y *Xenopus* 1. Estas se anestesiaron por hipotermia y se decapitaron con guillotina. Los ovarios se removieron usando tijeras y se colocaron en cajas Petri con medio de Barth modificado (88 mM de NaCl , 1 mM de KCl, 2.4 mM de $NaHCO_3$, 0.82 mM de $MgSO_4$, 0.33 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.42 mM de $CaCl_2$, y 5 mM de HEPES, pH 7.4). El medio fue suplementado con el antibiótico gentamicina a 0.1 mg/ml. Para remover las células foliculares que rodean al oocito, se trataron los folículos con colagenasa (0.5 mg/ml) disuelta en medio de Ringer por 40 min a temperatura ambiente.

Los oocitos se aislaron individualmente con pinzas de punta fina y se incubaron a 16°C por 24 h. Los oocitos se inyectaron a presión con un microinyector usando microagujas horneadas para eliminar cualquier contaminación con RNAsas. Se inyectaron 50 nl de RNAc (1 μg/μl) en el polo vegetal del oocito ó 10 nl de plásmido (1 μg/μl) en el núcleo. Varios días después, las corrientes eléctricas generadas por la aplicación de GABA y otros agonistas o antagonistas se registraron utilizando el método de los dos microelectrodos y fijación de voltaje que se ha empleado ya para la caracterización de otros receptores y canales iónicos (Gundersen *et al*, 1983a,b, 1984a,b, Miledi *et al*, 1982).

Los registros de las corrientes obtenidas fueron almacenadas en una computadora. Para el registro de las corrientes se utilizó el programa Nicolet (diseñado y hecho por Rico Miledi), y para el análisis se empleó el programa comercial Micrococal Origin (Northampton, MA, EUA).

2.3.7 Construcción de Receptores en Fusión con la Proteína Verde Fluorescente (GFP).

La GFP exhibe una fuerte señal fluorescente cuando es excitada a ciertas longitudes de onda (alrededor de 480 nm). Esta propiedad la ha convertido en un marcador casi ideal en sistemas de expresión heterólogos, ya que permite observar su expresión en tiempo real, así como determinar su localización subcelular y, debido a que no se tiene que fijar la célula que la expresa, permite analizar el tráfico intracelular de proteínas *in vivo* (Chalfie *et al*, 1994). Para estudiar si el DNAc de ρ1Δ450 es capaz de formar RNAm traducible a proteína y de ser anclado en la membrana plasmática, se construyeron dos genesde fusión. Uno entre ρ1 y GFP (el cual se usó como control positivo de expresión) y otro entre ρ1Δ450 y GFP. Se diseñó una estrategia de clonación que permitió la fusión en el marco de lectura adecuado, de tal manera que GFP se fusionó al extremo carboxilo de ρ1 o de ρ1Δ450 (Fig. 7). Por tanto, el péptido líder (el cual permite la incorporación de la proteína a la membrana plasmática) fue donado por el receptor.

Los plásmidos se inyectaron en el núcleo del oocito y las corrientes generadas se estudiaron usando la configuración de fijación de voltaje. Finalmente, los oocitos fueron estudiados bajo un microscopio confocal de fluorescencia.

2.3.8 Tamizaje de las isoformas del receptor ρ1 en el SNC bovino.

Se aisló RNA de varias áreas del sistema nervioso central (utilizando la técnica de Chomczynski y Sacchi, 1987) incluyendo cerebelo, hipocampo, amígdala, cuerpo calloso, nervio óptico y retina. Este RNA sirvió de templado para reacciones de retrotranscripción-PCR (Sambrook *et al*, 1989), utilizando los oligonucleótidos 1 y 2 descritos anteriormente en esta sección.

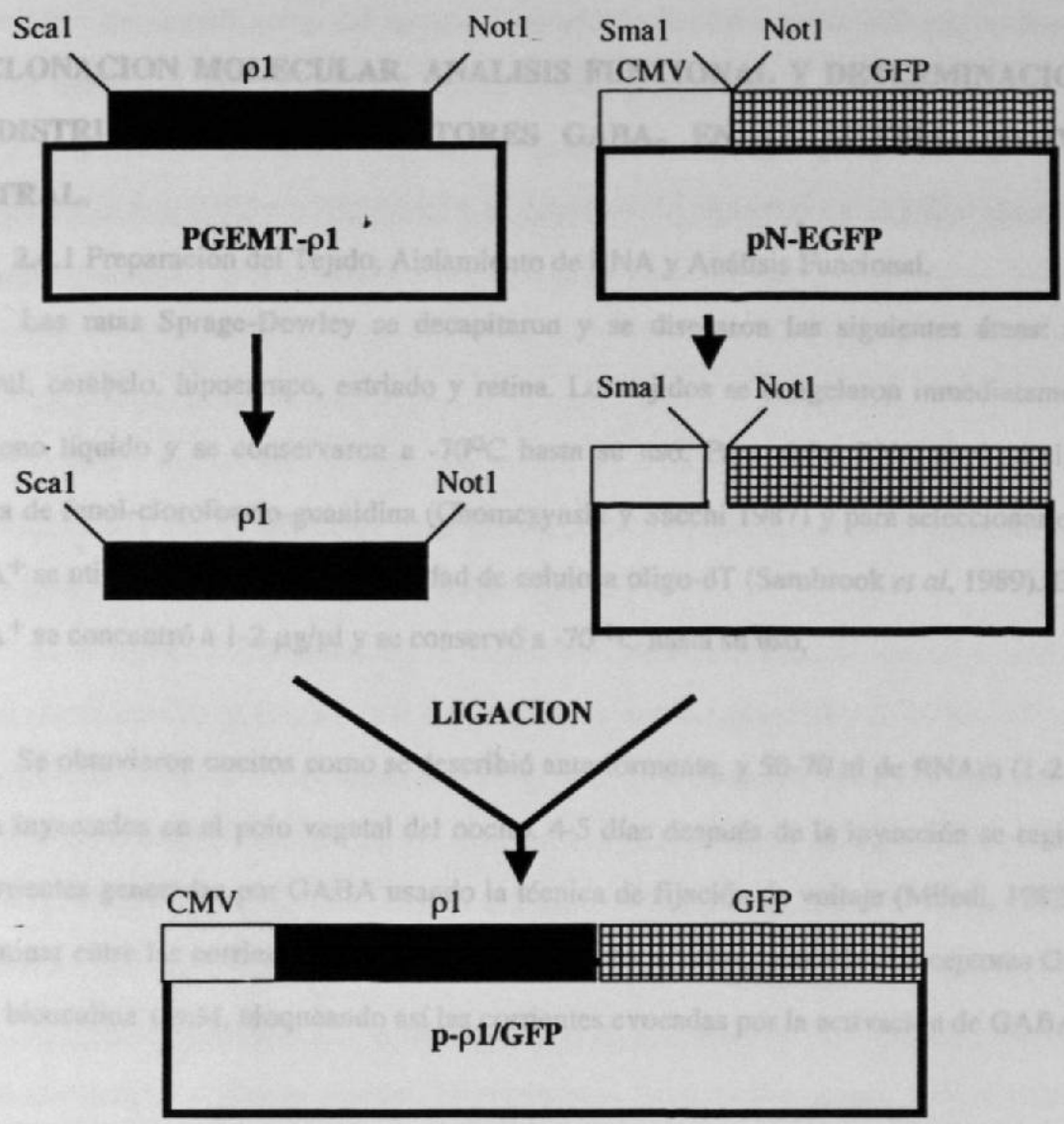

Figura 7. Estrategia de construcción del plásmido de expresión de la quimera ρ1-GFP. El primer paso consistió en modificar por mutación *in vitro* el DNAc de ρ1 de tal manera que se removió el codón de terminación traduccional y se introdujo un sitio *Not*1. El plásmido que contiene el DNAc modificado (pGEMT-ρ1) fue cortado con *Sca*1 y *Not*1 para liberar el fragmento correspondiente al DNAc de ρ1. Este fragmento fue clonado en el plásmido pN-EGFP, previamente cortado con *Sma*1 y *Not*1. El plásmido resultante (p-ρ1/GFP) se usó para inyectarlo en el núcleo de oocitos de *Xenopus*.

2.4 CLONACION MOLECULAR, ANALISIS FUNCIONAL Y DETERMINACION DE LA DISTRIBUCION DE RECEPTORES $GABA_C$ EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

2.4.1 Preparación del Tejido, Aislamiento de RNA y Análisis Funcional.

Las ratas Sprage-Dowley se decapitaron y se disecaron las siguientes áreas: corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, estriado y retina. Los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C hasta su uso. Para aislar RNA total se siguió la técnica de fenol-cloroformo-guanidina (Chomczynski y Sacchi 1987) y para seleccionar el RNA Poli-A^+ se utilizó una columna de afinidad de celulosa oligo-dT (Sambrook *et al*, 1989). El RNA Poli-A^+ se concentró a 1-2 μg/μl y se conservó a -70 ^{o}C hasta su uso.

Se obtuvieron oocitos como se describió anteriormente, y 50-70 nl de RNAm (1-2 μg/μl) fueron inyectados en el polo vegetal del oocito. 4-5 días después de la inyección se registraron las corrientes generadas por GABA usando la técnica de fijación de voltaje (Miledi, 1982). Para discriminar entre las corrientes generadas por el receptor $GABA_A$ y posibles receptores $GABA_C$, se usó bicuculina 1 mM, bloqueando así las corrientes evocadas por la activación de $GABA_A$.

2.4.2 Análisis por RT-PCR.

El RNA aislado de las diferentes regiones del cerebro se usó como templado para sintetizar el DNAc, utilizando la Transcriptasa Reversa de MMLV (Gibco, MD, EUA) y dos oligonucleótidos degenerados con homología a las secuencias conservadas de los receptores $GABA_C$. Los oligonucleótidos empleados fueron: 5'-YTTYGTBCATTCYAAAMGVTCM3-' y 5'-ACWGTGGAGAGGTARTTSACRG-3' (donde B=G+T+C, R=A+G, S=G+C, M=A+C, V=G+A+C, W=A+T, Y=C+T). La retrotranscripción constó de un paso a 50°C por 40 min con el oligonucleótido B y el programa de amplificación fue de 94°C por 1 min y treinta ciclos de

El producto de amplificación del tamaño esperado (aproximadamente 600 pb) se resolvió en geles de agarosa al 1%, la banda de interés se aisló por absorción a sílica y se ligó al vector pGEM-T (Promega, Madison WI, EUA). Los productos de ligación se utilizaron para transformar *E. coli* (DH5α o XL1-blue) y se determinó la secuencia nucleotídica por el método de Sanger (Sambrook et al 1989).

2.4.3 Hibiridación *in situ*.

Debido a que las señales obtenidas por RT-PCR fueron más abundantes en cerebelo que en cualquier otra área (a excepción de la retina), se decidió determinar por hibridación *in situ* la distribución de las tres diferentes subunidades tipo ρ.

Se sacrificaron ratas hembra y se decapitaron inmediatamente. Se disecó el cerebelo y se fijó en glutaraldehído al 4% por 24 h y se prepararon cortes horizontales de 20 μm utilizando un crióstato. Los cortes se prehibridaron a 37°C y se hibridaron por separado con ribo-sondas sentido y antisentido específicas de los receptores ρ1–ρ3. El buffer de hibridación consistió en: SSC 4X, dextran sulfato al 10%, EDTA a 2 mM, 50% formamida y 500 μg/ml de DNA de esperma de salmón. Cada sonda se marcó con rUTP-Biotina mediante la síntesis de RNAc *in vitro*. Se realizaron lavados de alta exigencia y se hizo la detección con anticuerpo anti-biotina ligado a la enzima fosfatasa alcalina. El revelado se llevó a cabo usando NBT y BCIP. Cada corte se analizó al microscopio de luz y se fotografió.

2.4.4 Construcción y Tamizaje de Una biblioteca de DNAc de Cerebelo Bovino.

Se obtuvieron tres cerebros completos de vaca adulta y se les disecó el cerebelo. Se aisló el RNA total (Chomczynski y Sacchi 1987) y se seleccionó el RNAm por cromatografía de afinidad a oligo dT (Sambrook *et al*, 1989). Este RNAm se utilizó como templado para reacciones de RT-PCR que permitieron identificar amplicones con secuencias semejantes a

receptores $GABA_C$. Este mismo RNAm se utilizó para construír una biblioteca de DNAc en el fago λ-ZAP (Invitrogen, La Jolla CA, EUA). La biblioteca se tamizó utilizando como sondas los fragmentos previamente amplificados por PCR, de las clonas positivas se aisló el DNA y a éste se le determinó su secuencia nucleotídica. Dos de estas clonas resultaron ser semejantes a los receptores ρ1 y ρ2 humanos, con algunas diferencias puntuales. Para lograr expresar estos DNAcs en oocitos de *Xenopus*, la región codificante se clonó en el vector pSP64T (Krieg y Melton 1984) y con el plásmido quimérico resultante se sintetizó el RNAc que se inyectó en el citoplasma del oocito. Posteriormente, se estudiaron las características de los receptores generados mediante la técnica de fijación de voltaje (Miledi, 1982).

2.4.5 Tamizaje de una Biblioteca de DNAc de Cerebro de Rata.

Con el fin de encontrar nuevos genes relacionados a los receptores $GABA_C$ en el sistema nervioso, se tamizó una biblioteca de DNAc de cerebro de rata (Invitrogen La Jolla CA, EUA), usando como sondas a los productos de amplificación de la PCR mostrados en la figura 15 de la sección de resultados, usando condiciones de baja exigencia durante el proceso de hibridación (Sambrook *et al*, 1989). Las clonas positivas fueron aisladas, secuenciadas y subclonadas en los vectores de expresión pSP64T (Krieg y Melton 1984) y pcDNA3.

2.5 MUTACIONES EN LOS SITIOS DE FOSFORILACION DEL RECEPTOR ρ1 Y CO-EXPRESION CON RECEPTORES ASOCIADOS A PROTEINAS G

2.5.1 Mutaciones Dirigidas

El receptor ρ1 tiene siete sitios que pueden ser potenciaimente fosforilados por proteína cinasas y tres de ellos (Ser 425, Ser 434 y Ser 441) se encuentran en la región de la segunda asa intracelular. Estos últimos fueron elegidos para modificarse *in vitro* porque están en contacto directo con el citoplasma, que es donde se encuentran las cinasas.

Los codones que codifican para estos residuos fueron cambiados por codones de alanina, utilizando oligonucleótidos sintéticos en la técnica de mutación por PCR en dos etapas (Picard et al, 1994). La primera reacción de PCR se realizó con el primer A=5'-CTCCTTCATCCACGACAC-3' en combinación con uno de los tres oligonucleótidos mutagénicos SER425=5'-GACCCTGGCCGCAGAGAGGA-3'; SER434=5'-ACAGAGGAA AGCTCAGAGAAGC-3' y SER441=5'-CAGCTATGTGGCCATGAGAATC-3', utilizando un programa de amplificación con 25 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min. Los productos amplificados (que portaban los fragmentos mutados) se resolvieron en geles de agarosa al 1% y se aisló la banda del peso molecular adecuado. Una vez aislados, cada fragmento se utilizó como "megaprimer" en reacciones de amplificación "asimétrica" utilzando 15 ciclos de 94 °C por 40 s y 72°C por 2 min. Finalmente, para extender la cadena de DNA hasta el extremo terminal de la región codificante de ρ1 se añadió a la reacción de PCR el "primer" B=5'-TACAGTTATTTCTGTAGT-3' y se utilizó el siguiente programa: 94°C 30 s, 55°C 30 s 72°C 1 min por 25 ciclos. Las reacciones de PCR se fraccionaron en geles de agarosa al 1% y los productos de alrededor de 1 Kb se aislaron y se digirieron con las enzimas *Bgl*II y *Sac*I. El fragmento *Bgl*II-*Sac*I se introdujo en el plásmido pAV111 (Calvo *et al*, 1994), el cual porta el DNAc del receptor ρ1 silvestre, con lo cual se introdujo cada mutación en construcciones independientes. Finalmente, para construir el triple mutante, se combinaron los fragmentos mutados en la primera reacción en una sola reacción de re-amplificación, lo que dió lugar a combinaciones de dobles y triples mutaciones.

Los cambios ó mutaciones introducidas fueron corroborados determinando la secuencia de los genes mutados (Sambrook *et al*, 1989). El triple mutante ($\rho 1_{(S425,434,441A)}$) se expresó en oocitos de *Xenopus* y sus propiedades se estudiaron por la técnica de los dos microelectrodos y fijación de voltaje (Miledi 1982).

2.5.2 Co-expresión de Receptores de Angiotensina (AT1) y ρ1

Los plásmidos portando los DNAcs de los receptores AT1 o ρ1 se linearizaron con *Sal I*. Los RNAcs de AT1 y ρ1 se sintetizaron *in vitro* utilizando la RNA polimerasa de T7 y se co-inyectaron en oocitos de rana. Las corrientes generadas por la activación de los receptores se determinaron mediante fijación de voltaje. ρ1 fue activado primero, hasta que alcanzó un nivel estable en sus respuestas. AT1 se activó luego con 0.1M ATIII y el efecto de esta activación sobre las corrientes generadas por el receptor ρ1 se midió a los 5, 10, 20, 30 y 40 min. Este estudio se realizó también con el receptor mutante $\rho 1_{(S425,434,441A)}$.

2.5.3 Expresión de la Segunda Asa Intracelular de ρ1 en *E. coli* y Fosforilación *in vitro*

La figura 8 muestra esquemáticamente la estrategia de clonación seguida para la construcción de un plásmido de expresión bacteriana. Se amplificó mediante PCR la región que codifica para la segunda asa intracelular del receptor ρ1 y el amplicón se cortó con las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Pst*1 y se introdujo en el vector de expresión pMALc2 (cortado con *Bam*H1 y *Pst*1). La secuencia nucleotídica de la construcción final se corroboró utilizando el método de secuenciación de Sanger (Sambrook *et al*, 1989). pMALc2-ρ1 se introdujo en la cepa TB1 de *E. coli* y la inducción de la expresión se llevó a cabo en matraces con medio LB suplementado con 0.1 mM IPTG, añadido en la fase temprana del crecimiento (0.4 DO determinada en un espectrofotómetro a una λ de 600 nm). Las bacterias fueron colectadas por centrifugación 3 h después de la inducción y la proteína recombinante se aisló por cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa (LaVaille 1987). La proteína purificada se visualizó en geles de poliacrilamida-SDS al 10% teñidos con azul de Coomassie (Sambrook *et al*, 1987). El mismo proceso se siguió para la proteína control de fosforilación, que fue la segunda asa intracelular de la subunidad β2 del receptor $GABA_A$ bovino.

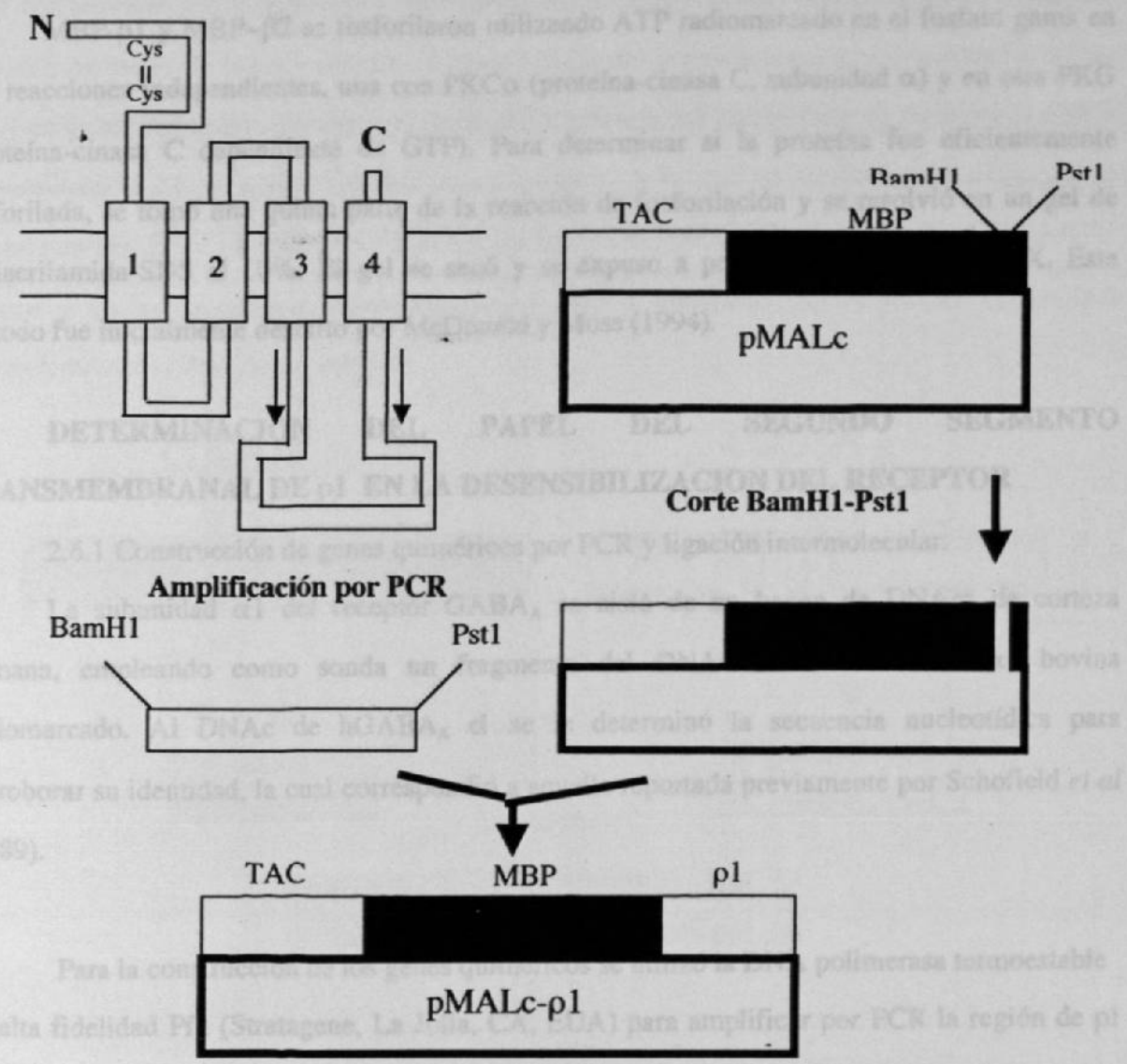

Figura 8. Estrategia para la expresión de la proteína fusión MBP-ρ1. La región que codifica para la segunda asa intracelular del receptor ρ1 se amplificó por PCR, lo cual permitió la introducción de un sitio *Bam*H1 en el extremo 5', de un sitio *Pst*1 en el extremo 3' y de un codón de terminación. Los sitios de restricción permitieron la clonación en la fase de lectura apropiada del fragmento codificando para la segunda asa intracelular (*Bam*H1-*Pst*I) en el vector pMALc. De este modo se creó el plásmido que permitió la expresión de una proteína fusión (MBP-ρ1/2ª asa) codificada por un gen fusión bajo el control transcripcional del promotor TAC.

MBP-ρ1 y MBP–β2 se fosforilaron utilizando ATP radiomarcado en el fosfato gama en dos reacciones independientes, una con PKCα (proteína-cinasa C, subunidad α) y en otra PKG (proteína-cinasa C dependiente de GTP). Para determinar si la proteína fue eficientemente fosforilada, se tomó una quinta parte de la reacción de fosforilación y se resolvió en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%. El gel se secó y se expuso a película sensible a rayos X. Este método fue inicialmente descrito por McDonald y Moss (1994).

2.6 DETERMINACION DEL PAPEL DEL SEGUNDO SEGMENTO TRANSMEMBRANAL DE ρ1 EN LA DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR

2.6.1 Construcción de genes quiméricos por PCR y ligación intermolecular.

La subunidad α1 del receptor $GABA_A$ se aisló de un banco de DNAcs de corteza humana, empleando como sonda un fragmento del DNAc de la subunidad α1 bovina radiomarcado. Al DNAc de $hGABA_A$ α1 se le determinó la secuencia nucleotídica para corroborar su identidad, la cual correspondió a aquella reportada previamente por Schofield *et al* (1989).

Para la construcción de los genes quiméricos se utilizó la DNA polimerasa termoestable de alta fidelidad Pfu (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) para amplificar por PCR la región de ρ1 que abarca desde el codón de iniciación hasta el final de la primer asa intracelular (figura 9). En una segunda reacción se amplificó el segmento de la subunidad α1 desde el inicio del segundo segmento transmembranal hasta el codón de terminación. Los fragmentos amplificados fueron ligados entre sí y clonados en los vectores de expresión pBSKS y pcDNA3. A la quimera así construída se le denominó ρ1/α1.

Para terminar el "transplante" del segundo segmento transmembranal, se amplificaron por PCR dos regiones (utilizando como templado ρ1/α1). En la primera reacción se amplificó desde el codón de inicio de la traducción de ρ1 hasta el fin del segundo segmento transmembranal de α1, y en la segunda reacción desde el inicio de la primera asa extracelular de ρ1 hasta el codón de terminación de su traducción. La nueva quimera, a la cual se le denominó $\rho 1_{(\alpha 1/TM2)}$ fue clonada en pBSKS y en pcDNA3. Cada una de las construcciones finales fue microinyectada en oocitos y las corrientes generadas por GABA fueron estudiadas por la técnica de los dos microelectrodos y fijación de voltaje.

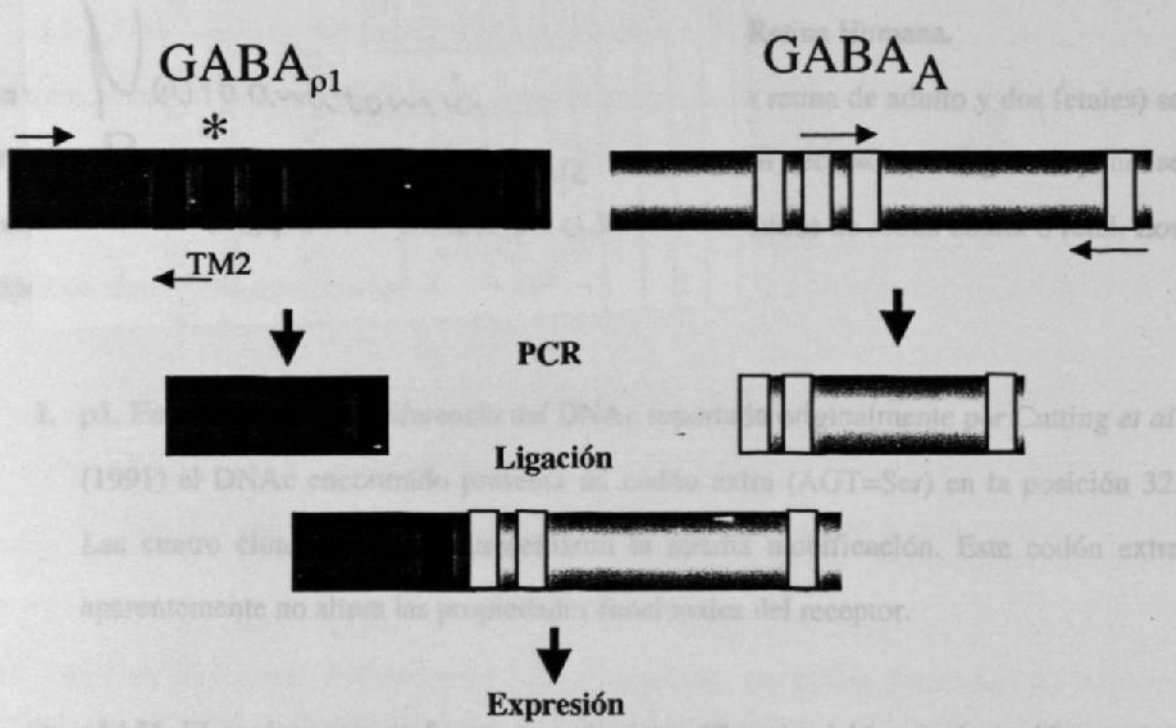

Figura 9. Estrategia para la construcción de genes quimera. Dos reacciones de PCR independientes amplificaron 1) la región corriente arriba de ρ1 y 2) la región 3´ de la subunidad α1 de $GABA_A$. Los fragmentos amplificado fueron ligados y subclonados en un vector de expresión.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1. CLONACION MOLECULAR Y EXPRESION FUNCIONAL DE FORMAS ALTERNATIVAS DEL RECEPTOR ρ1

3.1.1 Tres isoformas del Receptor ρ1 se Expresan en la Retina Humana.

De un total de cuatro bancos de DNAc de retina (dos bancos de retina de adulto y dos fetales) se aislaron tres diferentes tipos de clonas que codifican para un receptor ρ1 Fig. 10) y no se encontraron diferencias entre las secuencias de los DNAcs obtenidos de retina adulta o fetal. Los tres tipos de clonas corresponden a:

1. **ρ1.** En este receptor, a diferencia del DNAc reportado originalmente por Cutting *et al*, (1991) el DNAc encontrado presenta un codón extra (AGT=Ser) en la posición 32. Las cuatro clonas obtenidas presentaron la misma modificación. Este codón extra aparentemente no altera las propiedades funcionales del receptor.

2. **ρ1Δ51.** El cual carece de 51 nt, que eliminan 17 aminoácidos en la región amino terminal del receptor que codifica para la región extracelular del mismo. Tanto la secuencia líder, que permite que el receptor sea anclado a la membrana, como los segmentos transmembranales, se conservan intactos en esta isoforma.

3. **ρ1Δ450. El cual presenta una deleción en la misma región que ρ1Δ51, pero se extiende 450 nt hacia el carboxilo terminal. Esta deleción elimina claramente residuos críticos para el funcionamiento y ensamblaje adecuado de un receptor funcional.**

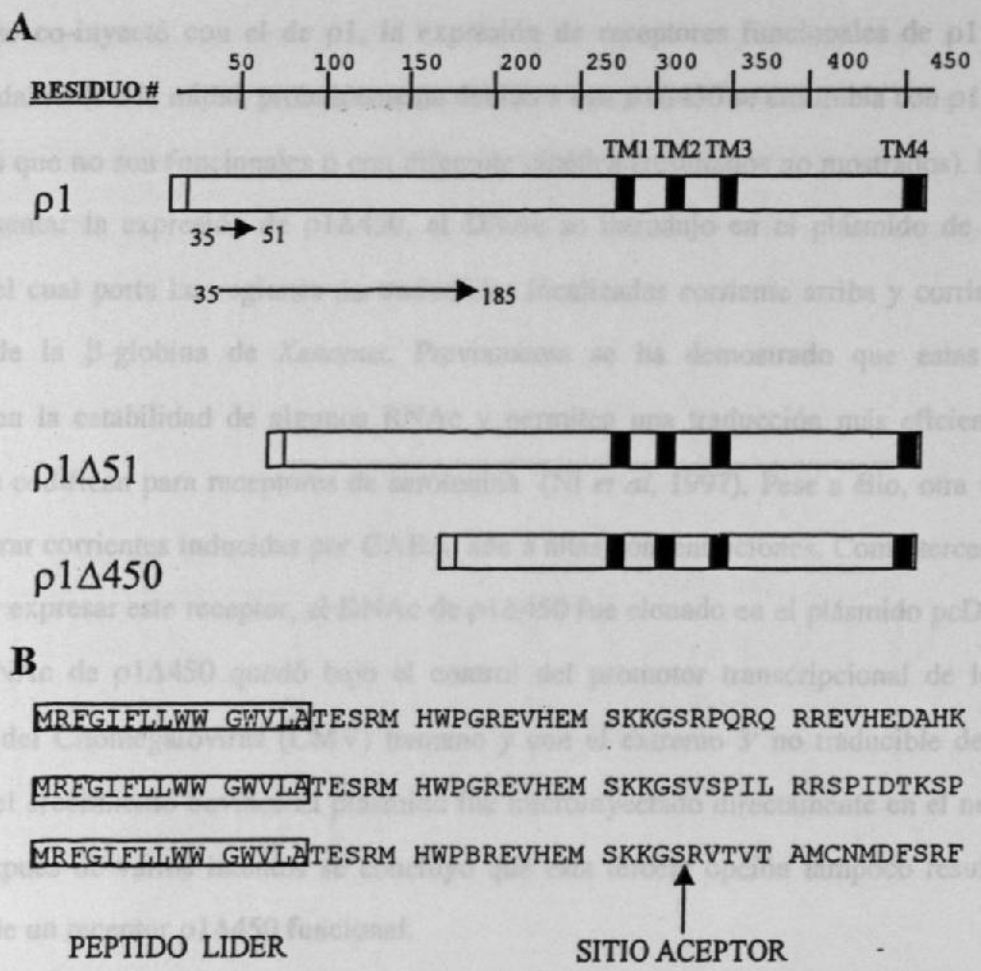

Figura 10. Tres isoformas del receptor ρ1 se expresan en retina humana. A) Algunos fragmentos del extremo amino-terminal del receptor ρ1 se remueven por "splicing" alternativo, de manera que se forman transcritos con deleciones de 51 (17 residuos en ρ1Δ51) y 450 nt (150 residuos en ρ1Δ450). Ambos transcritos tienen un marco de lectura completo. ρ1Δ51 no pierde dominios críticos para la formación de un receptor funcional, mientras que ρ1Δ450 pierde residuos necesarios para la formación de receptores funcionales. **B)** Supuesta secuencia aminoacídica del extremo amino-terminal de las isoformas de la subunidad ρ1, mostrando la región del péptido líder y el sitio de aceptor del "splicing" alternativo.

3.1.2 Expresión de ρ1Δ51 y ρ1Δ450 en Oocitos de *Xenopus*.

Depués de inyectar oocitos de varios donadores con varias preparaciones de RNAc de ρ1Δ450, no se logró detectar ninguna corriente generada por GABA. Cuando el RNAc de ρ1Δ450 se co-inyectó con el de ρ1, la expresión de receptores funcionales de ρ1 se redujo aproximadamente a la mitad, probablemente debido a que ρ1Δ450 se ensambla con ρ1 formando receptores que no son funcionales o con diferente cinética (resultados no mostrados). Para tratar de incrementar la expresión de ρ1Δ450, el DNAc se introdujo en el plásmido de expresión pSP64T, el cual porta las regiones no traducibles localizadas corriente arriba y corriente abajo del gen de la β-globina de *Xenopus*. Previamente se ha demostrado que estas regiones incrementan la estabilidad de algunos RNAc y permiten una traducción más eficiente de los RNAc que codifican para receptores de serotonina (Ni *et al*, 1997). Pese a éllo, otra vez no se logró generar corrientes inducidas por GABA, aún a altas concentraciones. Como tercera opción para lograr expresar este receptor, el DNAc de ρ1Δ450 fue clonado en el plásmido pcDNA3. En éste, el DNAc de ρ1Δ450 quedó bajo el control del promotor transcripcional de los genes tempranos del Citomegalovirus (CMV) humano y con el extremo 3' no traducible del gen de hormona del crecimiento bovino. El plásmido fue microinyectado directamente en el núcleo del oocito. Después de varios intentos se concluyó que esta tercera opción tampoco resultó en la produción de un receptor ρ1Δ450 funcional.

En contraste, los oocitos inyectados con el DNAc de ρ1Δ51 si formaron receptores funcionales, tanto aquellos inyectados con RNAc, como los que fueron inyectados intranuclearmente con DNA, (Fig. 11). Los receptores expresados por ρ1Δ51, como el receptor ρ1 silvestre, no son bloqueados por el alcaloide bicuculina y no se desensibilizan ni aún después de ser expuestos por largo tiempo a GABA. Las corrientes inducidas por bajas (0.1-0.2 μM) o altas (1 mM) concentraciones del agonista fueron bastante estables. Hay que hacer notar que en

algunas ocasiones las corrientes generadas decayeron apreciablemente después de exponerse a GABA (1mM), sin embargo el cambio en la conductancia se mantuvo constante mientras que el potencial de equilibrio generado por la acción de GABA cambió durante el tiempo en el que el oocito estuvo expuesto al agonista (Fig. 11B). De aquí se deduce que la aparente caída en la respuesta es debida principalmente a cambios en el gradiente de iones Cl^- através de la membrana, ocasionado por la apertura simultánea de un gran número de canales, y no debido a una desensibilización real de los receptores. Este hecho debe tenerse en mente cuando se diga que una célula (*c.f* retina) tiene receptores del tipo $GABA_C$ que se desensibilizan.

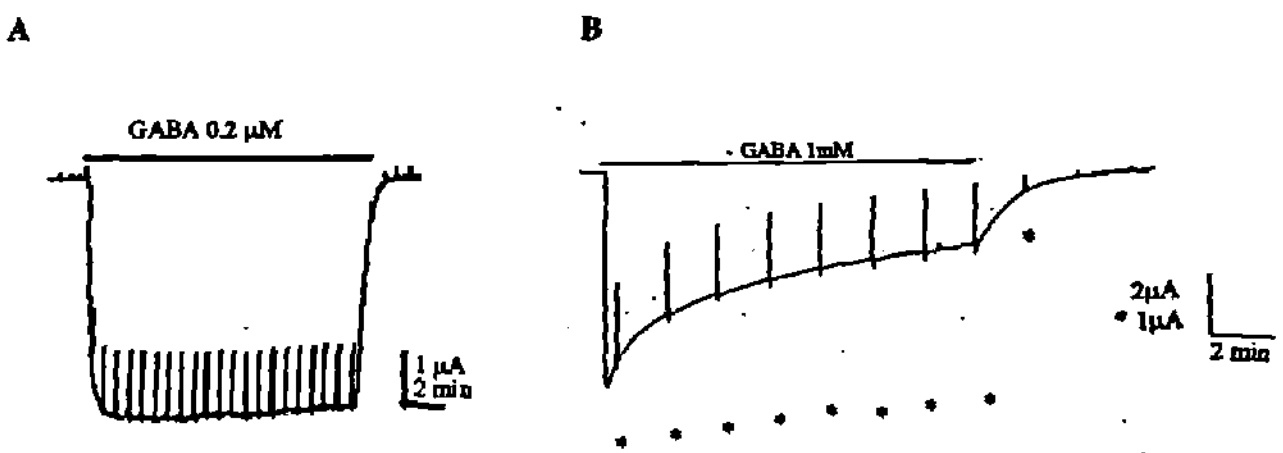

Figura 11. Expresión funcional de ρ1Δ51 en oocitos de *Xenopus*. El RNAc de ρ1Δ51 fue inyectado en oocitos de *Xenopus*. 48-72 h después, los oocitos generaron corrientes bastante robustas al ser expuestos a GABA. A) Las corrientes de ρ1Δ51 no desensibilizan aún después de varios minutos de exposición al agonista (GABA 0.2 mM). B) El mismo oocito se expuso a una concentración de GABA más alta (1mM) y las corrientes así generadas aparentan desensibilizar. Sin embargo, la conductancia (indicada por * y medida al estimular el oocito con pulsos de -30mV por 1 seg se mantuvo relativamente constante.

3.1.3 Caracterización Farmacológica del Receptor ρ1Δ51.

Con el fin de conocer las propiedades del receptor ρ1Δ51 se probaron varios agonistas y antagonistas que son conocidos por sus acciones sobre los receptores ρ1 y $GABA_A$. Primero se probó el efecto de los iones de Zn^{2+}, los cuales inhiben las respuestas a GABA en diversas preparaciones (Calvo *et al*, 1994; Chang *et al*, 1995; Dong y Werblin 1995, Wang *et al*, 1995). Los iones de Zn^{2+} bloquean al receptor ρ1 de manera dosis dependiente y con una inhibición media (IC_{50}) de 9.2 μM (Calvo *et al*, 1994). El receptor ρ1Δ51, activado por 5 μM de GABA, redujo su corriente generada a un 30% de la original cuando se expuso a 1 μM de Zn^{2+} (Fig. 12). Esta inhibición fue reversible después de lavar el oocito por 3 min para eliminar el catión.

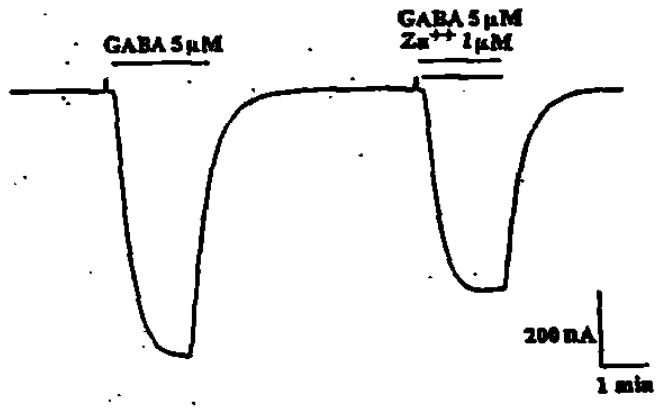

Figura 12. Bloqueo de ρ1Δ51 por iones de zinc. Al igual que para los receptores ρ1, las corrientes generadas por la isoforma ρ1Δ51 (expresada en la membrana de oocitos) son bloqueadas por iones de zinc de una manera dosis-dependiente.

Además, se sabe que los lantánidos tienen efectos moduladores sobre los receptores $GABA_A$ y ρ1 (Calvo *et al*, 1994; Im *et al*, 1992, Narahashi *et al*, 1994). Así mismo, en la isoforma ρ1Δ51 el La^{3+} produjo un aumento rápido y reversible de las corrientes generadas por GABA. Este efecto fue mayor cuando se incrementó la concentración de La^{3+}. Su potencia fue

independiente del voltaje al que se fijó el oocito y fue menos aparente cuando el receptor fue activado por altas concentraciones de GABA.

Los aminoácidos glicina y β-alanina son capaces de activar receptores $GABA_A$ y ρ1 (Calvo et al, 1995; Wu et al, 1992). Con el fin de determinar si la deleción en ρ151 afecta la capacidad de ρ1 para ser activado por estos neurotransmisores, se realizaron una serie de experimentos. Al probarse la acción de estas moléculas sobre el receptor expresado en oocitos, se encontró que la glicina genera corrientes con una EC_{50} de 1.2 mM y que β-alanina tuvo un efecto semejante aunque más potente (EC_{50} de 165 μM) (Fig. 13).

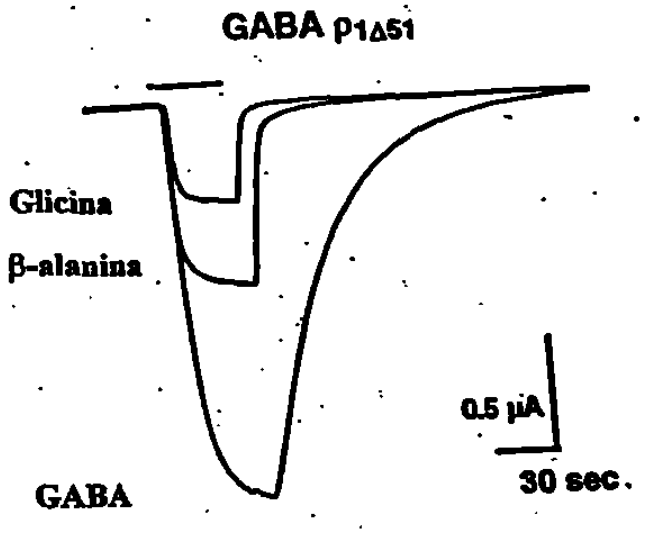

Figura 13. Corrientes generadas por GABA, glicina y β-alanina en oocitos inyectados con el plásmido de expresión de ρ1Δ51. Estos registros muestran las corrientes generadas por GABA (3μM), β-alanina (3mM) y glicina (30mM). Como se puede observar las corrientes son robustas y no-desensibilizantes.