

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



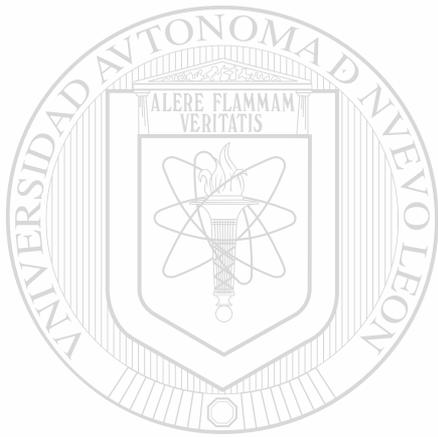
Expresión Funcional del Receptor GABA Rho1 Humano  
en Levaduras

POR:

M.C. Jorge Mauricio Reyes Ruiz

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología  
Molecular e Ingeniería Genética

Febrero, 2005



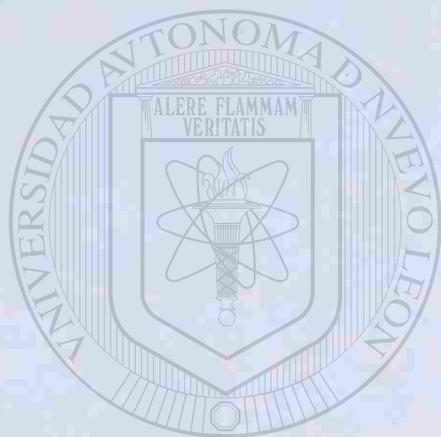
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C. Jorge Mauricio Reyes Ruiz

TD  
QP364  
.7  
.R4  
2005  
c.1



1080126700



# UANL

---

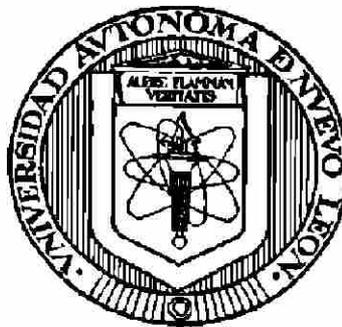
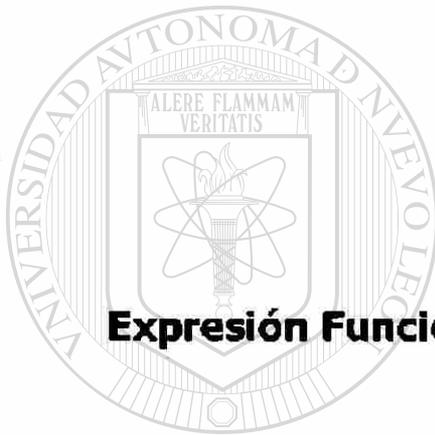
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**Expresión Funcional del Receptor GABA  $\rho$ 1 Humano  
en Levaduras**

**POR:**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

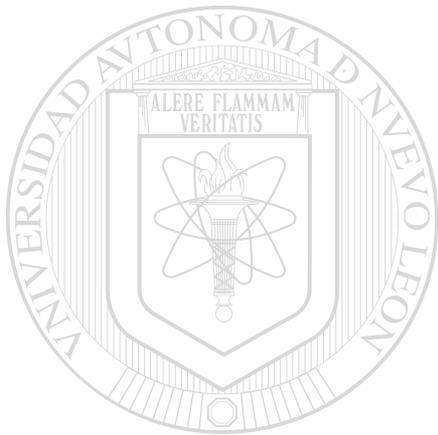
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C. Jorge Mauricio Reyes Ruiz

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología  
Molecular e Ingeniería Genética**

**Febrero, 2005**

TD  
QP364  
.7  
R4  
2005  
C.1



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

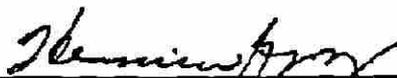
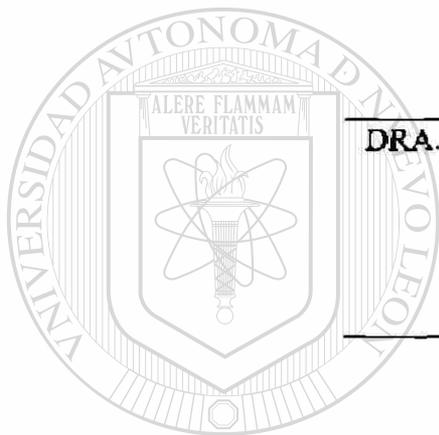


# EXPRESIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR GABA $\rho$ 1 HUMANO EN LEVADURAS

Aprobación de la Tesis:



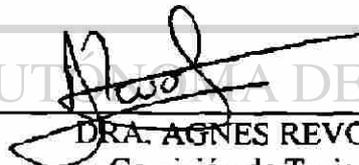
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA  
Director de Tesis



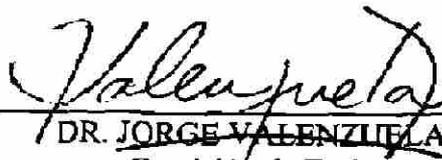
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ  
Comisión de Tesis



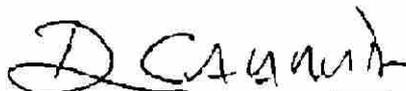
DR. BENTITO PEREYRA  
Comisión de Tesis



DRA. AGNES REVOL  
Comisión de Tesis



DR. JORGE VALENZUELA  
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO  
Subdirector de Estudios de Posgrado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Ricardo Miledi**, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su valiosa asesoría y apoyo durante la realización de mi tesis. Trabajar en su entorno ha sido la experiencia más enriquecedora, pues es un ejemplo de dedicación e inspiración para años por venir.

Al **Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña**, por aceptar ser mi asesor y por tener la confianza de recomendarme con el Dr. Miledi. Además, por ayudarme a conseguir apoyo económico para el primer año de mi estancia en Estados Unidos, cuando todo parecía indicar que iba a ser imposible.

A mi **Comisión de Tesis**, la **Dra. Herminia Martínez**, la **Dra. Agnes Revol**, al **Dr. Benito Pereyra** y al **Dr. Jorge Valenzuela** por sus comentarios que ayudaron a enriquecerla.

Al **Dr. Ataúlfo Martínez-Torres**, quien me guió en los primeros meses en mi estancia en Irvine. También contribuyó con comentarios que mejoraron el escrito final.

A las doctoras **Mascia Amici** y **Zulma Dueñas**, cuya compañía y apoyo fue parte fundamental en este trabajo. Ellas tuvieron la paciencia de enseñarme el arte de trabajar con ovocitos de *Xenopus*. La amistad que me brindaron es algo para guardar toda la vida.

A la **Dra. Itzel Evelyn Calleja Macías**, por su soporte técnico en la secuenciación de los plásmidos construidos.

A la **Dra. Annalisa Bernareggi**, por su apoyo en lo referente a los experimentos de electrofisiología, pero sobre todo, por brindarme su amistad.

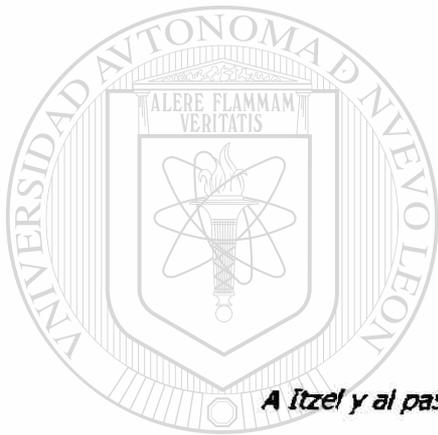
A **Mela Miledi**. No cabe duda que el dicho "detrás de un gran hombre hay una gran mujer" se cumplió cabalmente. Gracias por hacernos sentir a Itzel y mí siempre bien recibidos.

A todos los estudiantes que pasaron por el laboratorio del Dr. Miledi durante estos últimos 3 años y medio. De todos aprendí algo y compartimos momentos muy agradables.

A mis nuevos amigos californianos, todos de diferentes latitudes y altitudes, pero que el destino quiso que coincidiéramos en este tiempo y espacio. Compartir con ellos extra-laboratorio siempre sirvió para recargar las baterías.

A mi familia, los **Reyes-Ruiz: Papá, Mamá, René, Mayela, Marianita, Oscar Emillo, Diana, Vicente, Chentito, Dany, Cecy y Checo e Ileana**. Se que siempre cuento con ellos para lo que sea.

A mi otra familia, los **Macías-Hernández: Doña Evelia, Don Pepe, Doña Lidia, Alberto, Doña Laura, Wendy, Carlos, Lyrsa y Jorge**. Desde siempre me han hecho sentir parte de la familia y Xalapa se siente como mi segundo hogar.



**DEDICATORIA**

UANL

*A Itzel y al pasajero en su vientre. Por ustedes vale la pena.*

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

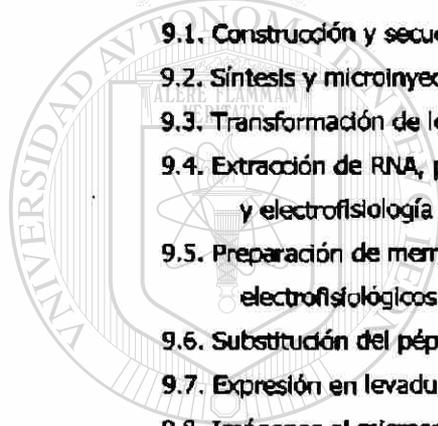
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Importancia de los neurotransmisores y sus receptores en el sistema nervioso central	1
1.2. El neurotransmisor Inhibidor más importante	2
1.3. Diferencias entre los receptores GABA <sub>A</sub> y GABA <sub>C</sub>	4
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
2.1. Estudios estructurales de receptores ionotrópicos	6
2.2. Levaduras como sistema de expresión heterólogo	7
2.3. Modificación del péptido líder	7
2.4. Sistema <i>Xenopus laevis</i>	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>9</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
4.1. Objetivo general	10
4.2. Objetivos específicos	10
<b>5. ESTRATEGIA GENERAL</b>	<b>11</b>
<b>6. LUGAR DE TRABAJO</b>	<b>12</b>
<b>7. MATERIALES</b>	<b>12</b>
7.1. Cepas y vectores	12
7.2. Reactivos	13
<b>8. MÉTODOS</b>	<b>13</b>
8.1. Construcción y secuenciación de los vectores de expresión	13
8.2. Síntesis de RNAc	19
8.3. Microinyección de RNAc a ovocitos del género <i>Xenopus</i>	20
8.3.1. Preparación y microinyección de los ovocitos	20
8.3.2. Registros electrofisiológicos de los ovocitos	21
8.4. Transformación de levaduras.	22
8.4.1. Confirmación de la transformación por PCR	23
8.4.2. Inducción de la expresión	25
8.5. Extracción de RNA	25
8.5.1. Ensayo de protección de la RNasa (RPA)	26
8.5.2. Purificación de RNA poliadenilado	28

8.6. Preparación de membranas plasmáticas de levadura	29
8.7. Inmunodetección de la proteína recombinante	31
8.8. Inyección de RNAm y membranas plasmáticas de levadura	33
8.9. Modificación del péptido líder de la proteína p1	35
8.9.1. Retrotranscripción (RT-PCR)	36
8.9.2. Subclonación	37
8.10. Imágenes en microscopio confocal	40
8.11. Purificación del receptor	40
8.11.1. Acoplamiento del ligando en matrices activadas	40
8.11.2. Cromatografía	42
<b>9. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
9.1. Construcción y secuenciación de los vectores	43
9.2. Síntesis y microinyección de RNAc y registros electrofisiológicos en oviductos	44
9.3. Transformación de levaduras y confirmación de la integración	46
9.4. Extracción de RNA, purificación y microinyección del poliadenilado y electrofisiología	48
9.5. Preparación de membranas de levadura, inmunodetección y registros electrofisiológicos	51
9.6. Substitución del péptido líder de la proteína p1	53
9.7. Expresión en levaduras del receptor p1 modificado con la secuencia S2	56
9.8. Imágenes al microscopio confocal	57
9.9. Purificación del receptor	60
9.9.1. Columnas con GABA y TPMPA como fase estacionaria	60
9.9.2. Columnas de Ni-NTA	61
<b>10. DISCUSIÓN</b>	<b>63</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>68</b>
<b>APÉNDICE Artículo generado de la tesis</b>	<b>76</b>



UNANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo topológico de las subunidades proteicas de los receptores GABA	3
Figura 2.	Diferencias estructurales entre los receptores GABA <sub>A</sub> y GABA <sub>C</sub>	5
Figura 3.	Diferencias en la tasa de desensibilización	5
Figura 4.	Estrategia general	11
Figura 5.	El epítipo V5H6 es colocado en fase de lectura	16
Figura 6.	Subclonación del gen p1V5H6 en el vector pAV111	17
Figura 7.	Los vectores de levadura son modificados para portar el epítipo V5H6	18
Figura 8.	Microinyección de ovocitos del género <i>Xenopus</i> y registros electrofisiológicos	22
Figura 9.	Microtransplante de membranas	34
Figura 10.	Modificación del péptido líder	38
Figura 11.	Caracterización de los vectores	43
Figura 12.	Secuenciación de los vectores	45
Figura 13.	Caracterización electrofisiológica del receptor portando el epítipo V5H6	46
Figura 14.	Confirmación por PCR en <i>S. cerevisiae</i>	47
Figura 15.	Confirmación por PCR en <i>P. pastoris</i>	47
Figura 16.	Extracción de RNA, RPA y aislamiento de poliadenilados	49
Figura 17.	Inyección de mensajeros de levadura	49
Figura 18.	Mensajeros de levaduras transformadas con el receptor fusionado con el epítipo V5H6	50
Figura 19.	Membranas de levadura e inmunodetección	51
Figura 20.	Inyección de membranas de levadura	52
Figura 21.	Corriente oscilatoria espontánea	53
Figura 22.	Modificación de péptido señal	54
Figura 23.	Secuenciación de la modificación para introducir el péptido S2	55
Figura 24.	Electrofisiología en el receptor modificado con la secuencia S2	55
Figura 25.	Comparación de la expresión usando el péptido nativo humano y el péptido de levadura	56
Figura 26.	Fluorescencia en microscopio confocal	58
Figura 27.	<i>Pichia pastoris</i> y microscopía confocal	59
Figura 28.	Cromatografía de afinidad usando la columna de TPMPA	60
Figura 29.	Cromatografía de afinidad usando Ni-NTA como fase estacionaria	61

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Condiciones de la reacción para la confirmación por PCR	24
Tabla 2.	Reactivos utilizados para la preparación de un mini-gel en gradiente 3-15%	31
Tabla 3.	Condiciones de la reacción de RT-PCR	36
Tabla 4.	Programa utilizado para la RT-PCR	37
Tabla 5.	Vectores construidos	44
Tabla 6.	Vectores construidos para la modificación del péptido señal	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	albúmina sérica bovina
opm	cuentas por minuto
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	dimetil sulfoxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
DNAc	DNA complementario
dNTPs	desoxiribonucleótidos trifosfatados
DTT	ditiotreitól
°C	grados centígrados
g	gramos
g	fuerza de gravedad
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GFP	proteína verde fluorescente
h	horas
L	litros
M	molar
$\mu$ m	micrómetros
mA	miliamperios
min	minutos
mm	milímetros
mM	milimolar
mL	mililitros
$\mu$ L	microlitros
nA	nanoamperios
Ni-NTA	matriz de ácido nitrilotracético cargada con níquel
nL	nanolitros
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
pH	potencial de hidrógeno
RNA	ácido ribonucleico
RNAc	RNA complementario sintetizado <i>in vitro</i>
RNAm	RNA mensajero
rNTPs	ribonucleótidos trifosfatados
RPA	ensayo de protección de la RNasa
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	retrotranscripción por PCR
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes
TPMPA	(1,2,5,6 – tetrahydropyridine-4-yl) ácido metilfosfónico
vol	volumen

## RESUMEN

Jorge Mauricio Reyes Ruiz Fecha de Graduación: Febrero de 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: "Expresión Funcional del Receptor GABA  $\rho 1$  Humano en Levaduras"

Número de Páginas: 76

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Área de Estudio: Neurobiología

**Propósito y Método de Estudio:** Los neurotransmisores son sustancias químicas almacenadas en pequeñas vesículas en las terminales de las neuronas y al ser liberados durante la sinapsis, transmiten un mensaje que estimula, inhibe o modula el impulso nervioso. El mecanismo de acción de los neurotransmisores es por medio de su interacción con receptores proteicos que se encuentran en la membrana plasmática de las neuronas, teniendo una relevancia especial al ser éstos en particular los blancos de muchos fármacos. Existe una gran cantidad de receptores de neurotransmisores que faltan de ser caracterizados a nivel molecular y su estudio se ha visto impedido principalmente por la dificultad de obtenerlos de sus tejidos nativos y también por su naturaleza hidrofóbica, la que hace difícil su purificación tras expresarlos en sistemas de producción de proteínas heterólogas. Este trabajo combinó la biología molecular y la neurobiología con el fin de producir el receptor GABA $\rho 1$  en levaduras para su estudio fisiológico y estructural.

**Contribuciones y Conclusiones:** El receptor pudo ser expresado de manera funcional en levaduras del género *Saccharomyces* y modificaciones realizadas al receptor para facilitar su purificación no afectaron sus propiedades electrofisiológicas. Usando cromatografía de afinidad, el receptor expresado en levaduras pudo ser enriquecido. Sin embargo, los niveles obtenidos resultaron muy bajos, haciendo este sistema inadecuado para estudios estructurales. El sistema desarrollado para la purificación mostró ser eficiente, por lo que si otro sistema de expresión es usado en el futuro para expresar este receptor, se podrá aprovechar esta estrategia.



Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña  
Asesor Interno



Dr. Ricardo Miledi  
Asesor Externo

# Expresión Funcional del Receptor GABA $\rho 1$ Humano en Levaduras

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Importancia de los neurotransmisores y sus receptores en el sistema nervioso central

Un neurotransmisor es una sustancia secretada por las neuronas y que se difunde sobre una corta distancia a las células blanco, donde produce una respuesta fisiológica. El neurotransmisor puede alterar el flujo iónico y producir despolarización o hiperpolarización, o puede alterar el metabolismo de la célula blanco. El estudio de las funciones que llevan a cabo los neurotransmisores en el cerebro es una parte primordial

dentro de la neurociencia. Entender el papel que juegan en la recepción y transmisión de señales ha ayudado con el paso de los años a comprender el mecanismo de algunos padecimientos, así como a diseñar medicamentos tales como anestésicos, antidepresivos, etc. El mecanismo de acción de los neurotransmisores es por medio de su interacción con receptores que se encuentran en la membrana plasmática de las neuronas, abriendo o cerrando canales iónicos, por lo que el estudio de estos receptores tiene una relevancia especial al ser éstos, en particular, los blancos de una gran cantidad de fármacos. Además, los receptores de neurotransmisores juegan un papel importante en numerosas etiologías. En el caso de la miastenia gravis, el receptor de acetilcolina sufre un ataque autoinmune provocando los síntomas propios de esta enfermedad

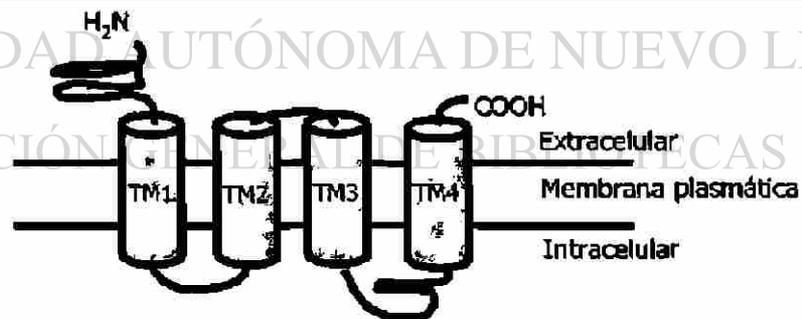
(Hoedemaekers *et al.*, 1997). La enfermedad de Alzheimer (Toda *et al.*, 2003), la epilepsia (Lauren *et al.*, 2003) y la esquizofrenia (Lipska *et al.*, 2003) son otros tres ejemplos de padecimientos en los que existe evidencia de que algunos receptores de neurotransmisores no funcionan adecuadamente. Existe una gran cantidad de receptores de neurotransmisores que faltan por ser caracterizados y su estudio se ve impedido principalmente por la dificultad de obtenerlos de sus tejidos nativos, así como por su naturaleza hidrofóbica que hace difícil su purificación tras expresarlos en sistemas de producción de proteínas heterólogas. Una vez que estos receptores sean caracterizados a fondo, podrán ser diseñados medicamentos más específicos. Sin embargo para llegar a un alto nivel de entendimiento de la función de estos receptores, hacen falta estudios de tipo estructural.

### **1.2. El neurotransmisor inhibitor más importante**

El principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central de los mamíferos es el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), siendo su papel esencial el inhibir el potencial sináptico excitatorio de las neuronas (Roscosky, 1997). Se ha estimado que un 40% de todas las inhibiciones sinápticas son a través de este aminoácido (Johnston, 1981; Martin y Dunn, 2002). Después de su liberación, el GABA se difunde e interactúa con sus receptores hiperpolarizando a las células postsinápticas. El GABA ejerce sus funciones inhibitorias uniéndose a, por lo menos, tres subclases de receptores estructural y farmacológicamente diferentes: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub> (Watling, 1998; Enna y Bowery, 1997). Mientras que los receptores A y C son canales de Cl<sup>-</sup>, los

receptores de la subclase B están acoplados a canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , vía proteínas G (Bowerly y Enna, 2000).

El receptor GABA<sub>A</sub> funciona como canal de  $Cl^-$  controlado por ligando. El incremento de la conductancia de la membrana plasmática de las neuronas al  $Cl^-$  produce hiperpolarización (un potencial electromotriz intracelular más negativo) y disminuye la excitabilidad nerviosa. La estructura del receptor GABA<sub>A</sub> es típica de la mayoría de los receptores ionotrópicos regulados por ligando (Olsen y Delgado-Escueta, 1999). Presuntamente compuesto de cinco subunidades proteicas dispuestas en círculo para formar un poro o canal, permanece cerrado hasta que se une el GABA (Barnard *et al.*, 1993; Nayeem *et al.*, 1994). Cada subunidad es una cadena de residuos aminoacídicos con cuatro regiones altamente hidrofóbicas (TM1-TM4), las que son potenciales formadoras de regiones transmembranales, un dominio N-terminal extracelular hidrofílico, el cual contiene parte del sitio de unión a GABA (Enz y Cutting, 1998) y un lazo citoplasmático largo entre TM3 y TM4 (Fig. 1).



**Figura 1. Modelo topológico de las subunidades proteicas de los receptores GABA.** Cada subunidad atraviesa cuatro veces la membrana y en su extremo amino se encuentra el sitio de unión a GABA.

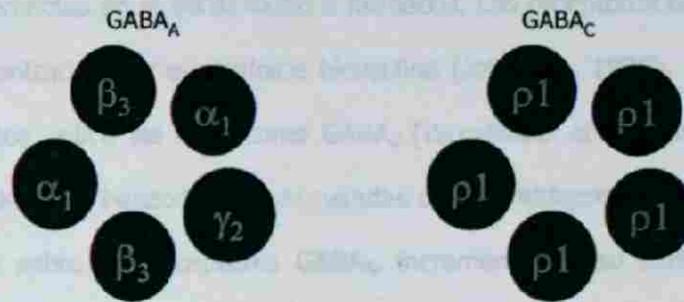
Los receptores GABA<sub>C</sub> se descubrieron inicialmente en retinas de mamíferos, por lo que se les denominó receptores GABA<sub>retina</sub>, GABA<sub>trc</sub> o GABA<sub>p</sub> (Polenzani *et al.*, 1991).

Sin embargo, otros estudios han sugerido que pueden estar presentes en células CA3 del hipocampo durante estadios tempranos del desarrollo murino (Strata y Cherubini, 1994) y en cerebelo e hipocampo de mamíferos (O'Hara BF *et al.*, 1995). Estos receptores también pertenecen a la familia de canales iónicos regulados por ligando, al igual que GABA<sub>A</sub>. Hasta hoy, 3 tipos de DNAC de receptores GABA<sub>C</sub> han sido clonados: GABA $\rho$ 1, GABA $\rho$ 2 y GABA $\rho$ 3 (Cutting *et al.*, 1991, 1992; Ogurusu y Shangai, 1996; Johnston, 1996; Qian *et al.*, 1998). Todos ellos son expresados abundantemente en la retina, compartiendo una similitud de 70-77% entre ellos y alrededor del 35% con la secuencia aminoacídica de los miembros de la familia GABA<sub>A</sub>.

### 1.3. Diferencias entre los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>

A pesar de que los receptores de las subclases A y C comparten similitudes estructurales y funcionales, ambos presentan propiedades fisiológicas y farmacológicas peculiares, por ejemplo:

1) Estructura cuaternaria del receptor. Mientras que el receptor GABA<sub>A</sub> es un polímero de subunidades polipeptídicas que forman el canal iónico de forma hetero-oligomérica, la subclase GABA<sub>C</sub> forma receptores funcionales homo-oligoméricos, es decir, formados por subunidades idénticas (Fig. 2). Además, los receptores GABA<sub>A</sub> requieren del acoplamiento de al menos dos tipos de subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo también necesaria la intervención de otras subunidades accesorias ( $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\pi$ ) para adquirir algunas de las características propias de esta clase de receptores.

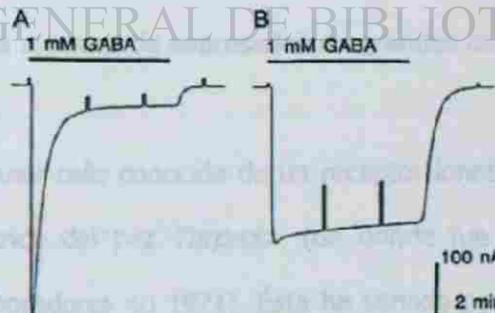


**Figura 2. Diferencias estructurales entre los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>.** Una de las diferencias más notables entre los receptores GABA A y C es su conformación hetero-oligomérica para el caso de la subclase A (izquierda), contra una conformación homo-oligomérica en el caso de la subclase C (derecha).

2) Diferencias en las tasas de desensibilización. Después de unos cuantos segundos de que un receptor GABA<sub>A</sub> es activado por GABA se inicia un declive (desensibilización) en la amplitud de la corriente generada, esto a pesar de la presencia continua del agonista. Además, si el agonista es aplicado repetidamente, las respuestas subsecuentes disminuyen en amplitud. Al contrario, los receptores GABA<sub>C</sub> se desensibilizan muy poco o nada (Polenzani *et al.*, 1991). La presencia del agonista después de 10 minutos o más de exposición, hace que disminuya la respuesta tan solo

entre un 0-10%, y aplicaciones repetidas del agonista no llevan a una disminución marcada de las respuestas posteriores (Fig. 3).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 3. Diferencias en la tasa de desensibilización.** (A) Corriente generada por GABA en un ovocito inyectado con RNA poliadenilado extraído a partir de corteza cerebral bovina. (B) Corriente generada por GABA en un ovocito inyectado con RNA poliadenilado extraído a partir de retina bovina. (Tomado de Polenzani *et al.*, 1991).

3) Diferencias en la sensibilidad a fármacos. Los receptores GABA $\alpha$  se distinguen por ser antagonizados por el alcaloide bicuculina (Johnston, 1996), pero este alcaloide no tiene efectos sobre los receptores GABA $\rho$  (Woodward *et al.* 1992, 1993; Strata y Cherubini, 1994). Las benzodiazepinas, usadas como antidepresivos y relajantes, tienen efecto directo sobre los receptores GABA $\alpha$ , incrementando su actividad inhibitoria al aumentar la hiperpolarización neuronal (Costa y Guidotti, 1996), mientras que los receptores GABA $\rho$  son insensibles a las benzodiazepinas (Woodward *et al.*, 1993).

Estos resultados han planteado nuevas interrogantes sobre las relaciones estructura-función de este nuevo receptor, que solo podrán ser contestadas una vez que se cuente con suficiente cantidad de proteína para hacer los estudios pertinentes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Estudios estructurales de receptores ionotrópicos

El análisis de la estructura de receptores GABA $\alpha$  y GABA $\rho$  ha sido muy difícil debido a la poca abundancia de estos receptores en la membrana plasmática neuronal y a los problemas enfrentados al tratar de expresarlos en grandes cantidades en sistemas heterólogos recombinantes.

La estructura molecular más conocida de un receptor ionotrópico es el receptor nicotínico del órgano eléctrico del pez *Tarpedo* (de donde fue purificado el primer receptor, por Miledi y colaboradores en 1971). Ésta ha servido por muchos años como modelo del (típico) receptor ionotrópico (Unwin, 1995, 1996). Sin embargo, su estudio ha sido facilitado en parte por la alta concentración de receptores presentes en la

membrana de los electrocitos, lo que ha permitido obtener imágenes por microscopía electrónica con una resolución de hasta 4 Å (Miyazawa *et al.*, 2003).

## 2.2. Levaduras como sistema de expresión heterólogo

El uso de levaduras modificadas genéticamente representa una alternativa para solucionar el problema de la baja abundancia de este tipo de receptores en los tejidos nativos. Su uso para la producción de proteínas heterólogas solubles es ampliamente conocido (Cereghino *et al.*, 2002) y existe evidencia de que *S. cerevisiae* es capaz de expresar receptores nicotínicos y para dopamina en la membrana plasmática (Fujita *et al.*, 1986; Sander *et al.*, 1994). Por su parte, *Pichia pastoris* ha sido empleada para expresar receptores acoplados a proteínas G, tales como el receptor  $\mu$  opioide y de serotonina (Weiss *et al.*, 1995, 1998), el receptor humano de endotelina (Schiller *et al.*, 2001), y el receptor humano de dopamina (de Jong *et al.*, 2004).

Aunque el análisis funcional de los receptores expresados en levaduras se complica debido a su pared celular y al tamaño tan pequeño de éstas, lo cual dificulta utilizar métodos electrofisiológicos directos, esta dificultad fue afrontada utilizando una alternativa que permite el "transplante" de membranas plasmáticas de cualquier tipo celular a ovocitos de rana (Marsal *et al.*, 1995), en donde se realizó el análisis funcional.

## 2.3. Modificación del péptido líder

Con el antecedente de una mejoría en la expresión de proteínas de membrana en levaduras cuando el gen de interés fue modificado al agregársele un péptido líder nativo

de levadura (Yellen y Migeon, 1990), varios trabajos reportan la modificación del péptido líder para expresar proteínas de membrana en estos eucariotes (Weiss *et al.*, 1995, 1998; Talmont *et al.*, 1996; Abdulaev *et al.*, 1997; Schiller *et al.*, 2000, 2001). De igual manera, en este proyecto el gen GABA $\rho 1$  fue modificado, reemplazando su péptido líder por el de una proteína de membrana de levadura.

#### 2.4. Sistema *Xenopus laevis*

El sistema de expresión usando ovocitos del género *Xenopus laevis* fue introducido por Gurdon en 1971 como medio para estudiar varios aspectos del control de expresión génica. Los primeros estudios se enfocaron en proteínas no membranales, de poco interés para los neurobiólogos, tales como la globina, el interferón y varias proteínas virales. Sin embargo, a principios de 1982, Miledi y colaboradores demostraron que varios tipos de canales iónicos podían ser expresados heterológamente en ovocitos tras la inyección de RNAs mensajeros aislados de diversos tejidos (Miledi *et al.*, 1982;

Barnard *et al.*, 1982). A partir de entonces, este sistema se ha convertido en una herramienta de rutina para el estudio de receptores, canales iónicos y de transportadores. Su uso como modelo para estudios electrofisiológicos es muy extenso, ya que presenta muchas ventajas que lo hace un sistema muy versátil. Primeramente, el tamaño del ovocito (1 a 1.5 mm) es muy conveniente para su manipulación y presenta la ventaja de que puede ser microinyectado fácilmente con ácidos nucleicos o proteínas embebidas en la membrana plasmática. Si se hace una inyección con DNA, éste deberá ser inyectado en el núcleo y el gen de interés estar regulado por algún promotor transcripcional potente. El DNA es transcrito a RNA, éste a su vez dirigido al citoplasma, donde se traduce a proteínas que son movilizadas dentro del ovocito por su sistema de

tráfico intracelular y ensambladas en la membrana plasmática. El RNA es inyectado en el citoplasma y éste es traducido a proteínas que son dirigidas a su localización celular final. Cuando son membranas las microinyectadas, las vesículas membranales conteniendo receptores son difundidas a la membrana plasmática del ovocito e incorporadas a ésta, permitiendo que los receptores embebidos puedan ser estudiados en su ambiente lipídico nativo. Esta metodología ha sido empleada ampliamente para estudiar receptores utilizando RNA mensajero (Barnard *et al.*, 1982; Miledi *et al.*, 1983; Gundersen *et al.*, 1983, 1984; Carpenter *et al.*, 1988; Wahl *et al.*, 1993), así como a partir de membranas plasmáticas (Marsal *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 2003; Miledi *et al.*, 2004).

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Los receptores GABA juegan un papel primordial en la transmisión sináptica y a través de ésta, en todas las funciones del cerebro. Una buena cantidad de compuestos comúnmente utilizados en la práctica médica, tales como barbitúricos y benzodiazepinas, actúan a través de la modificación de las propiedades de estos receptores. Por lo tanto, el estudio detallado de su estructura proveerá información clave para entender su función, así como para diseñar con mayor precisión fármacos altamente específicos. Con la producción del receptor GABA $\rho_1$  en grandes cantidades en levaduras se aportará un modelo de estudio útil para dilucidar las propiedades estructurales y funcionales del receptor GABA $\rho_1$  y otros receptores en general.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

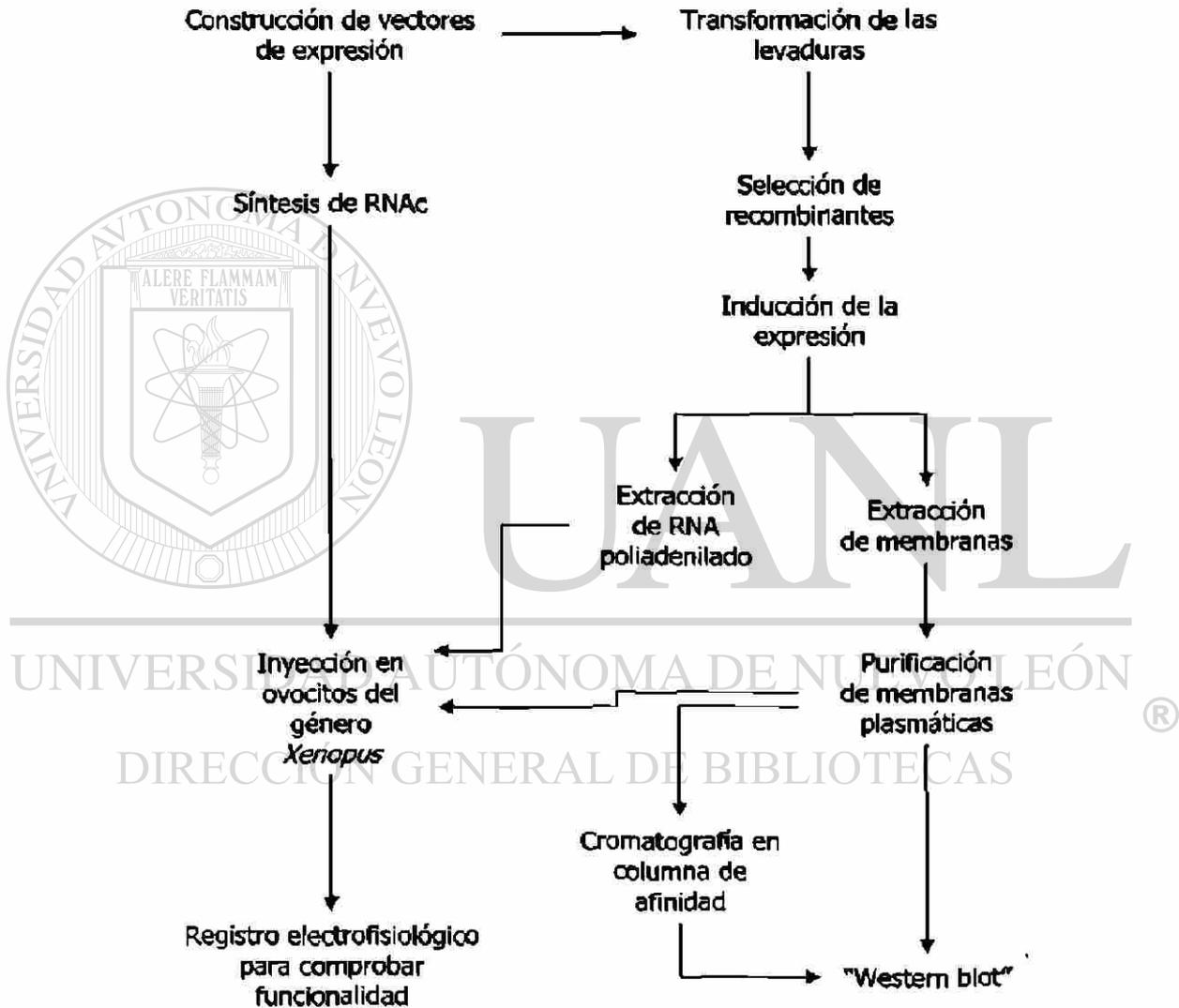
Expresar el receptor GABA  $\rho_1$  humano de manera funcional en levaduras.

### 4.2. Objetivos específicos

1. Subclonar el DNAc del receptor GABA $\rho_1$  en plásmidos de expresión para las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* y utilizarlos para transformar las cepas DY150 y TD4 de *S. cerevisiae* y GS115 y SMD1168 de *P. pastoris*.
2. Seleccionar clones recombinantes que expresen el receptor.
3. Aislar las membranas plasmáticas y los RNA mensajeros de las cepas de levaduras expresoras e inyectarlas a los ovocitos de *X. laevis*, para llevar a cabo la caracterización electrofisiológica y comprobar que los receptores recombinantes expresados por las levaduras son funcionales.
4. Establecer condiciones para purificar el receptor para su análisis funcional y estructural.

## 5. ESTRATEGIA GENERAL

Para alcanzar los objetivos propuestos se implementó la estrategia general descrita en la figura 4.



**Figura 4. Estrategia general.** Los objetivos de este trabajo se dividen en donación, expresión, análisis funcional y purificación del receptor GABA $\rho 1$ .

## 6. LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se llevó a cabo como una colaboración entre el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Departamento de Neurobiología y Comportamiento de la Universidad de California, campus Irvine. La parte experimental se realizó principalmente en el Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular en Irvine, California.

## 7. MATERIALES

Los matraces de fondo dentado (baffled flasks) para el crecimiento de levaduras en Fisher Scientific, división de equipo de laboratorio (Pittsburgh, PA, EUA). Las ranas usadas en los experimentos de electrofisiología fueron compradas en Nasco, (Madison, WI, EUA) y Xenopus Express (Plant City, FL, EUA). El "puller" utilizado para microinyección, en Narishige (Long Island, NY, EUA). El microinyector neumático y las micropipetas para inyección se adquirieron en Drummond (Broomall, PA, EUA). La película radiográfica se obtuvo en Amersham (Uppsala, Suecia). La nitrocelulosa empleada en los experimentos de inmunodetección se obtuvo en Pall-Gelman (Windsor, NJ, EUA).

### 7.1. Cepas y vectores

Las cepas y vectores fueron adquiridos en Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA); ATCC, (Manassas, VA, EUA); Clontech, (Palo Alto, CA, EUA). Para la propagación de los vectores se usó la bacteria *Escherichia coli*, cepas DH5 $\alpha$  [Invitrogen, genotipo F $\phi$ 80d/lacZ  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17* (rk-, m k+) *phoA* *supE44*  $\lambda$ -*thi-1* *gyrA96* *reA1/F* *proAB+* *lacqZ* $\Delta$ M15 Tn10(*tet*)], y Top 10 [Invitrogen, genotipo F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*)  $\phi$ 80/lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 *deoR* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara*-

*leu17697 gal1 galK rpsL endA1 nupG*]. Los vectores de expresión para levaduras usados fueron: pYEXBX de Clontech para *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que para la levadura *Pichia pastoris* se utilizó el plásmido pPIC9 de Invitrogen. Las cepas de *S. cerevisiae* usadas fueron DY150 [ATCC, genotipo *MATa, Ura<sup>3-52</sup>, Leu<sup>2-3</sup>, Leu<sup>2-112</sup>, Trp<sup>1-1</sup>, Ade<sup>2-1</sup>, His<sup>3-11</sup>, Can<sup>1-100</sup>*] y TD4 [ATCC, *MATa, His<sup>4-519</sup>, Ura<sup>3-52</sup>, Leu<sup>2-2</sup>, Leu<sup>2-112</sup>, Trp<sup>1-1</sup>, Gal<sup>2</sup>, Can<sup>1</sup>, (citr<sup>+</sup>)*]. Para los experimentos con *P. pastoris* se usaron las cepas GS115 [Invitrogen, genotipo *his4*] y SMD1168 [Invitrogen, genotipo *pep4, his4*].

## 7.2. Reactivos

Los reactivos fueron adquiridos en Sigma, St. Louis, MO, EUA. Los estuches para manipulación de RNA fueron comprados en Qiagen (Valencia, CA, EUA), Ambion, (Austin, TX, EUA), Promega, (Madison WI, EUA), y Roche (Indianápolis, IN, EUA); las enzimas de restricción, modificación y DNA polimerasas fueron obtenidas en New England BioLabs, (Beverly, MA, EUA) e Invitrogen. Los reactivos usados en electroforesis fueron adquiridos en Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) y los de análisis de proteínas en Pierce (Rockford, IL, EUA). Los anticuerpos para los experimentos de inmunodetección fueron obtenidos en Sigma, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA) y en ABR-Affinity Bio-Reagents (Golden, CO, EUA).

## 8. MÉTODOS

### 8.1. Construcción y secuenciación de los vectores de expresión

Para facilitar la localización celular del receptor usando un microscopio de fluorescencia, se manipuló al gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP por

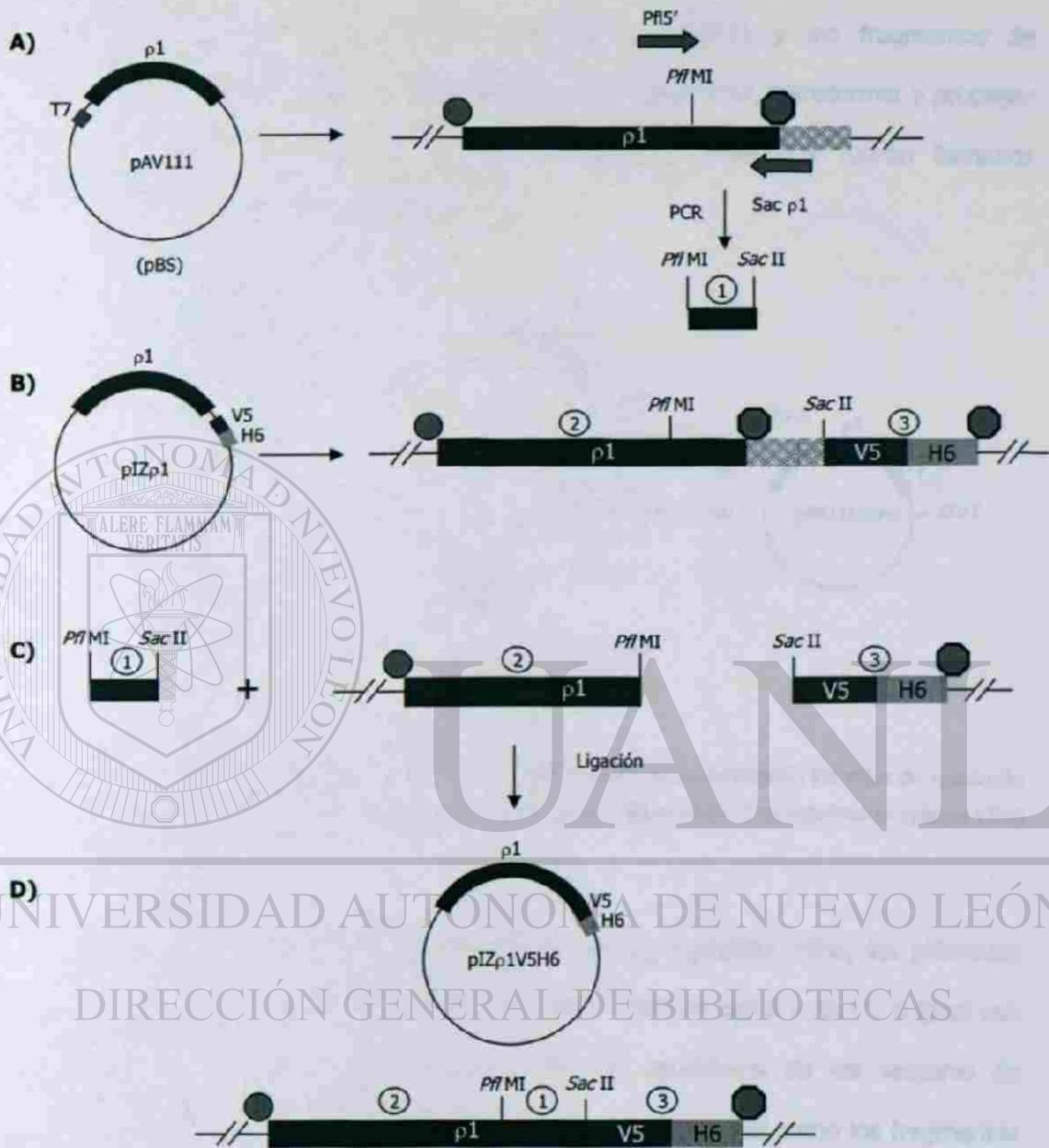
sus siglas en inglés) para fusionar ésta al extremo carboxilo del receptor. Los vectores pYEXBX $\rho 1$  y pYEXBX $\rho 1$ GFP fueron construidos por el Dr. Ataúlfo Martínez-Torres por medio de subclonaciones partiendo de los vectores pAV111 (Calvo *et al.*, 1994; Martínez-Torres *et al.*, 1997) y pCDNA3 $\rho 1$ GFP (Martínez-Torres *et al.*, 2000). La construcción de los vectores de *P. pastoris* fue mediante subclonaciones usando pPIC9,

Para facilitar la purificación del receptor se llevó a cabo la construcción de vectores llevando una cola de 6 histidinas (H6), fusionada al epítipo V5 como una alternativa para la inmunodetección, utilizando el vector de expresión para células de Insecto pIZV5H6 (Invitrogen). A este vector se le había introducido previamente el gen  $\rho 1$ , aunque sin quedar en fase de lectura con el epítipo V5H6. Se diseñaron iniciadores para eliminar el codón que detiene la traducción y se le introdujo un sitio de restricción para que permitiera la fusión con el epítipo V5H6. La secuencia del iniciador 5' fue la siguiente: 5' actacatgccagagaatggagagaagc 3' (Pfl 5'), el cual contiene en su secuencia el sitio de restricción Pfl MI. Mientras que para el extremo 3' se diseñaron dos iniciadores: uno para poner en fase de lectura el epítipo V5H6 con el gen  $\rho 1$  y otro para el gen  $\rho 1$ -GFP, los cuales tienen un sitio de restricción Sac II: 5' tcccogoggggagaaaatagaccagtatattaa 3' (Sac $\rho 1$ ) y 5' tcccogoggttgtagacagctcgtocatg 3' (SacGFP) (Figura 5A).

La PCR se practicó utilizando la polimerasa de alta fidelidad Deep Vent (New England BioLabs) y en el termociclador MJ Research PTC-150 se programaron 30 ciclos, (tras 95°C por 2 min para la desnaturalización inicial) cada uno consistiendo de un paso de desnaturalización a 95°C por 1 min, apareamiento a 60°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y un paso de extensión final de 72°C por 7 min.

El vector pIZV5H6, así como los productos amplificados, fueron digeridos con las enzimas *Pst*MI y *Sac*II (Figura 5B). Los productos de la digestión fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% y los fragmentos de interés fueron purificados usando el estuche comercial QIAquick (Qiagen, cat# 28704). Dichos fragmentos fueron unidos mediante una reacción de ligasa, usando la T4 DNA Ligasa (Invitrogen, cat# 15224025) (Figura 5C). Una relación de 1:10 vector:inserto fue mezclada con 4  $\mu$ L de buffer de ligasa 5 veces concentrado y 10 unidades de ligasa para un volumen final de 20  $\mu$ L. La reacción se incubó a temperatura ambiente toda la noche (aproximadamente 16 h). Un volumen de 5  $\mu$ L de reacción fue resuelto en un gel de agarosa al 1.5% para comprobar que la ligación se hubiera llevado a cabo. Tras comprobarse que la reacción fue exitosa, se procedió a transformar la ligación en *E. coli* para propagar el plásmido. La técnica empleada fue la transformación de células químicamente competentes usando cloruro de calcio (Sambrook *et al.*, 2000). Colonias aisladas fueron recuperadas con un asa bacteriológica y usadas para inocular 4 mL de medio LB con ampicilina. Tras 15 h de incubación con agitación a 37°C, se extrajo el DNA plasmídico usando el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2000). Los plásmidos obtenidos fueron caracterizados con enzimas de restricción para comprobar que contaban con los insertos esperados. Los vectores generados en este punto fueron llamados pIZ $\rho$ 1V5H6 y pIZ $\rho$ 1GFPV5H6 (Figura 5D).

El siguiente paso fue construir los vectores que pudieran ser utilizados para producir RNAc que sería inyectado a los ovocitos del género *Xenopus*, a fin de comprobar que la introducción del epítipo V5H6 no tuviera un efecto adverso en la actividad biológica del receptor  $\rho 1$ . Para lograr esto, se digirieron los vectores pAV111 y pIZ $\rho$ 1V5H6, así como pIZ $\rho$ 1GFPV5H6 con las enzimas *Bgl*II y *Dra*I.



**Figura 5. El epítipo V5H6 es colocado en fase de lectura.** A) Usando el vector pAV111 como templado para una mutagénesis sitio-dirigida, se obtuvo un fragmento a cuyo extremo 3' le fue agregado un sitio de restricción *Sac*II (1). B) El vector pIZ $\rho 1$  fue digerido con las enzimas *Pfu*MI y *Sac*II, al igual que el producto de amplificación. Se ilustra con un 2 la parte 5' del gen  $\rho 1$  y con un 3 el epítipo V5H6. C) El vector y el fragmento fueron ligados y transformados para dar lugar al vector pIZ $\rho 1$ V5H6, mostrado en D). ● Codón de inicio. ● Codón de terminación.

Tras purificar el esqueleto proveniente de pAV111 y los fragmentos de pIZ $\rho 1$ V5H6 y pIZ $\rho 1$ GFPV5H6, se procedió a ligar los fragmentos, transformar y propagar los vectores como se describió antes. Los vectores obtenidos fueron llamados pAV111V5H6 y pAV111GFPV5H6 (Figura 6).

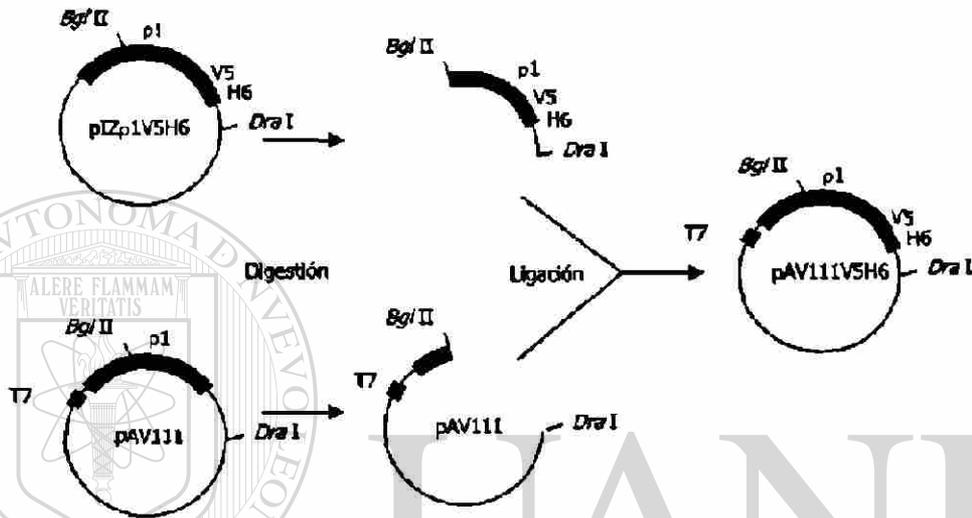
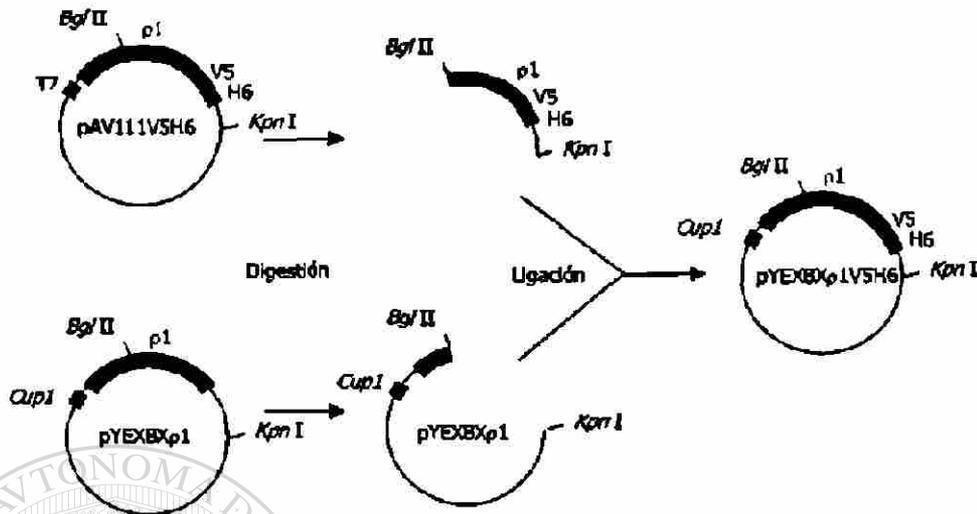


Figura 6. Subclonación del gen  $\rho 1$ V5H6 en el vector pAV111. Aprovechando los sitios de restricción *Bgl II* y *Dra I* presentes de manera única en los vectores pIZ $\rho 1$ V5H6 y pAV111 se subclonó el epítipo V5H6 en el vector pAV111.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Para obtener los vectores de levaduras con el polipéptido V5H6, los plásmidos pYEXB $\rho 1$  y pYEXB $\rho 1$ -GFP fueron digeridos con las enzimas *Bgl II* y *Kpn I*, al igual que los vectores pAV111V5H6 y pAV111GFPV5H6. Los esqueletos de los vectores de levadura fueron recuperados del gel como se describió antes, así como los fragmentos generados tras la digestión de los vectores pAV111V5H6 y pAV111GFPV5H6 y se ligaron y transformaron. Los vectores obtenidos en este punto fueron denominados pYEXB $\rho 1$ V5H6 y pYEXB $\rho 1$ GFPV5H6 (Figura 7).



**Figura 7.** Los vectores de levadura son modificados para portar el epítipo V5H6. Usando los sitios de restricción *Bgl* II y *Kpn* I se pudo subclonar el epítipo V5H6 para modificar los vectores de expresión de levaduras.

Para comprobar que la modificación de los vectores no afectara la secuencia del gen, los vectores fueron secuenciados utilizando el estuche comercial ABI PRISM BigDye

terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer Applied Biosystem, cat# 80213) versión 3.1. Los iniciadores utilizados para la secuenciación fueron diseñados de manera que se

aparearan unas decenas de bases antes de los sitios de restricción utilizados en las subclonaciones, para que así la reacción de secuenciación diera los resultados más

adecuados. La reacción consistió de 2  $\mu$ l del buffer de reacción (5X), el cual contiene la DNA polimerasa, 2  $\mu$ L del respectivo iniciador (0.8  $\mu$ M), 1.5  $\mu$ L del terminador, 1.5  $\mu$ L del

vector a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L y agua hasta obtener un volumen final de 10  $\mu$ L. La reacción se sometió a un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 3 min,

seguido de 24 ciclos a 96°C por 30 s, 50°C por 15 s y 60°C a 4 min. Una vez terminado este proceso, la reacción fue precipitada con una mezcla conteniendo 3  $\mu$ L de acetato de

sodio al 3 M pH 4.6, 62.5  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% y 14.5  $\mu\text{L}$  de agua por muestra. La muestra fue agitada en vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min, se centrifugó por 20 min a 14,000 rpm, y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue lavada con 250  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y centrifugada por 5 min a 14,000 rpm. El sobrenadante fue descartado y la pastilla se secó al aire. La reacción de secuenciación fue analizada en un secuenciador automatizado ABI Prism 377.

## 8.2. Síntesis de RNAC

Los vectores cuyo esqueleto estaba basado en pAV111 (pBS) se usaron para la síntesis de RNAC *in vitro* usando el estuche comercial RiboMax (Promega, cat# P1300) con la enzima T7 RNA polimerasa. Cinco  $\mu\text{g}$  de vector fueron primeramente digeridos con la enzima *Sa*/I por una hora a 37°C. Posteriormente, el producto de la digestión fue purificado por medio de una extracción de fenol-cloroformo y precipitación con acetato de sodio y etanol. La pastilla obtenida fue resuspendida en 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y cuantificada al espectrofotómetro. Un  $\mu\text{g}$  de vector fue usado como templado para la reacción de síntesis de RNA *in vitro*. La reacción consistió en 1  $\mu\text{g}$  de DNA templado, rNTPs a una concentración de 25 mM, excepto el rGTP, el cual se usó a 2 mM. Un análogo de la capucha 5' (Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analog, Promega, cat# P1712) se utilizó a una concentración de 2.5 mM. Los reactivos se mezclaron a temperatura ambiente con el buffer 5X de la T7 RNA polimerasa y se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de enzima en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Tras una incubación de 2 h a 37°C, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de DNAsa libre de ribonucleasas y se incubó por 15 min a 37°C. El RNA sintetizado fue entonces purificado por medio de una extracción con fenol-cloroformo y posterior precipitación

con acetato de sodio y etanol. La pastilla fue resuspendida en 30  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Tras dividir en alícuotas de 5  $\mu$ L, el RNA fue congelado inmediatamente en hielo seco. Una alícuota fue utilizada para cuantificar el RNA al espectrofotómetro y para correr un gel de agarosa con formaldehído para verificar su integridad.

### 8.3. Microinyección de RNAc a ovocitos de *X. laevis*

#### 8.3.1. Preparación y microinyección de los ovocitos

Ranas de *X. laevis* fueron anestesiadas con ácido 3-aminobenzoico (Sigma-Aldrich cat# 12,767-1) al 0.2% agregado en el agua y sacrificadas por medio de decapitación con guillotina, tras confirmar inconsciencia por falta de movimiento corporal. Los sacos de ovarios fueron retirados y lavados en solución de Ringer (NaCl a 115 mM, KCl a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 1.8 mM, HEPES a 5 mM, pH 7.0) y mantenidos a 16°C en solución de Barth (NaCl a 88 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a 0.33 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0.41 mM, KCl a 1 mM, MgSO<sub>4</sub> a 0.82 mM, NaHCO<sub>3</sub> a 2.4 mM, HEPES a 10 mM, pH 7.4). Ovocitos en estadios V y VI fueron desprendidos de los ovarios con pinzas finas y expuestos a un tratamiento de collagenasa (Sigma cat# C9263) a 0.5 mg/mL en solución de Ringer por 40 min. Tras 24 h de un periodo de recuperación para los ovocitos, se prepararon viales de 25-30 ovocitos en solución de Barth. Siempre se separó un vial de ovocitos, los cuales no fueron inyectados para ser usados como control negativo.

La preparación de las agujas de vidrio para la microinyección se llevó a cabo usando un "puller" marca Narishige con el calentador (heater) calibrado a 8  $\frac{1}{4}$ , y el magneto (magnet) y el magneto principal (main magnet) calibrados a 6  $\frac{1}{2}$ . El inyector

neumático usado (Drummond) se calibró para que inyectara 50.6 nL. Capilares de vidrio (7" Drummond #3-00-203-G/XL) fueron convertidos en agujas y la punta fue cortada bajo un estereoscopio usando una puntilla de micropipeta y llenadas con aceite mineral usando una jeringa. La aguja llena con aceite mineral se adaptó en el inyector y se comprobó bajo el estereoscopio que no estuviera goteando. Se procedió a calentar el RNAc a 70°C por 1 min y se colocó en hielo. Dos  $\mu\text{L}$  de muestra de RNAc a una concentración de 1-2 mg/mL se depositaron en un trozo de papel parafilm y la muestra fue succionada por la aguja usando el inyector neumático. Una vez comprobado que no se hubieran introducido burbujas, un vial con ovocitos fue removido de la incubadora y los huevos colocados en una caja petri la cual fue modificada al adaptársele una red de nylon de 1mm<sup>2</sup>, misma que sirve para que los ovocitos se inmovilicen al inyectarlos. Tras moverlos cuidadosamente con una pipeta Pasteur (la cual ha sido calentada para formar una punta roma) y orientarlos de manera que el ecuador estuviera visible, se procedió a microinyectarlos.

### 8.3.2. Registros electrofisiológicos de los ovocitos

Los ovocitos inyectados fueron incubados a 16°C en viales de vidrio en solución de Barth con gentamicina a 0.1 g/L y monitoreados cada día para remover los que no estuvieran viables. Usando el método de los dos electrodos (Miledi, 1982), cada ovocito fue colocado en una cámara, la cual se perfundió continuamente con solución de Ringer sola o con diferentes concentraciones de GABA ( $10^{-6}$  M,  $10^{-3}$  M), TPMPA  $10^{-3}$  M [(1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl) ácido metilfosfónico, anatagonista específico del receptor GABA<sub>C</sub>], Zinc  $10^{-3}$  M (bloqueador) y Lantano  $10^{-3}$  M (potenciador) y las corrientes

generadas por los canales de iones fueron captadas en los electrodos insertados en el ovocito. Las corrientes amplificadas fueron registradas en el programa Nicolet y los datos analizados en el programa Microcal Origin 6.0. Por lo menos tres ovocitos de cada experimento fueron registrados y los valores de sus corrientes promediados (Figura 8).



**Figura 8. Microinyección de ovocitos del género *Xenopus* y registros electrofisiológicos.** Partiendo de un vector conteniendo el gen de interés regulado por el promotor de la T7 RNA polimerasa, se llevó a cabo una síntesis de RNA *in vitro*, el cual fue microinyectado en ovocitos de *X. laevis*, mismos que son capaces de expresar el gen de manera funcional para caracterizar electrofisiológicamente sus corrientes generadas por sustancias tales como glicina (Gly),  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -Ala), GABA, etc.

#### 8.4. Transformación de levaduras

Las levaduras fueron transformadas por medio del método de LiCl como se describe en Geitz y Schiestl, 1995. Cuando se transformó *S. cerevisiae*, el plásmido fue empleado sin digerirlo previamente, mientras que cuando se transformó *P. pastoris* los vectores fueron linealizados con Sa/I. Una colonia crecida en placa de medio YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 1%, glucosa al 2% y agar al 2%) se usó para sembrar 4 mL de YPD líquido, el cual se creció durante toda la noche y al día siguiente se tomó un mL para inocular 25 mL de YPD. El crecimiento fue monitoreado hasta que el medio alcanzó una densidad óptica de 0.8 a 600 nm. Las células fueron colectadas por centrifugación a 1,500g por 10 min, resuspendidas en 20 mL de agua estéril y centrifugadas nuevamente. La pastilla fue resuspendida en 500  $\mu$ L de LiCl al 100 mM y

la suspensión transferida a un tubo de 1.5 mL y centrifugada a máxima velocidad por 15 s para remover el LiCl. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de LiCl al 100 mM y se usaron 50  $\mu$ L de la suspensión por cada transformación. A cada reacción de transformación se agregaron 240  $\mu$ L de PEG al 50% (PM 3500), 36  $\mu$ L de LiCl al 1 M, 25  $\mu$ L de DNA de cadena sencilla a 2 mg/mL (hervido previamente por 5 min y colocada en hielo) y DNA plasmídico (5 – 10  $\mu$ g) en 50  $\mu$ L de agua estéril. La suspensión se agitó en vortex hasta que la pastilla se mezcló completamente y se incubó a 30°C sin agitación por 30 min seguido de una incubación a 42°C por 25 min. El tubo se centrifugó a 6,000g por un min y la solución transformadora se removió. La pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua estéril y se esparció en una placa de YNB (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos al 0.67%, glucosa al 2% y agar al 2%) deficiente de uracilo cuando se transformó *S. cerevisiae*, y de RDB (medio de dextrosa de regeneración: sorbitol al 1 M, dextrosa al 2%, YNB al 1.34%, biotina al  $4 \times 10^{-5}$  %, 0.005% de los aminoácidos glutamato, metionina, leucina, lisina e isoleucina) en el caso de *P. pastoris*. Tras 3-5 días, las colonias resultantes fueron recuperadas y sembradas en medio YNB deficiente de uracilo (*S. cerevisiae*) o en YPD (*P. pastoris*). Tras crecerlas por 16 h a 30°C, se prepararon stocks en glicerol, los cuales fueron almacenados a -70°C.

#### 8.4.1. Confirmación de la transformación por PCR

Para aislar el DNA a usar como templado se usó la técnica de PCR directo descrito por Linder y colaboradores en 1996, empleando liticasa para liberar el DNA de las levaduras. A continuación se describe el protocolo de esta técnica: se tomó con un palillo de dientes estéril una colonia de una placa y se resuspendió en 10  $\mu$ L de agua

estéril. Se le agregaron 5  $\mu\text{L}$  de una solución de 5U/ $\mu\text{L}$  de Iiticasa (Sigma, cat# L4025), se mezcló y se incubó a 30°C por 30 min. La muestra se colocó a -70°C por 15 min y se tomaron 5  $\mu\text{L}$  para la reacción de PCR. Para detectar el transgen en el DNA genómico de *S. cerevisiae*, se usaron los iniciadores 5' tggctcaagaagatctggg 3' (Bgl5') y 5' ggaggcattcaocgocgtg 3' (TM13') tanto para el caso de  $\rho 1$  como el de  $\rho 1\text{GFP}$ . El programa utilizado fue el siguiente: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min, y un paso de extensión final de 7 min a 72°C. Las condiciones de reacción se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de la reacción para la confirmación por PCR.

Componente	Concentración final
Agua estéril	-
Buffer 10X	1X
dNTP's	0.2 mM cada uno
MgSO <sub>4</sub>	2.5 mM
Iniciador 5'	0.4 $\mu\text{M}$
Iniciador 3'	0.4 $\mu\text{M}$
DMSO	5%
Taq polimerasa	0.08 U/ $\mu\text{L}$

Nota: el volumen de reacción final fue 25  $\mu\text{L}$ .

Para el caso de *P. pastoris*, se usaron los iniciadores AOX5' (5' gactggttocaattgacaagc 3'), AOX3' (5' gcaaattggcattctgacatcc 3'), Bgl3' (5' gaccagatcttcttgaccagccgg 3'), SnaBI5' (5' ttttacgtaactgaaagcagaatgcactgg 3') y SacGFP 3' (5' tccccggcgtgtacagctcgtocatg 3') en diferentes combinaciones para verificar la integridad de los transgenes.

#### 8.4. 2. Inducción de la expresión

Colonias aisladas de *S. cerevisiae* obtenidas en placas de YNB deficientes de uracilo fueron crecidas en 50 mL de medio YPD suplementado con  $\text{CuSO}_4$  a 1 mM por tres días, con agitación a 300 rpm a 30°C. Para el caso de *P. pastoris*, las colonias obtenidas en medio deficiente de histidina fueron crecidas en 50 mL de medio MMY (medio mínimo con metanol: YNB al 1.34%, biotina al  $4 \times 10^{-5}$  % y metanol al 1%) por 5 días. Si las células estaban destinadas para extraer RNA, la inducción era detenida a las 24 h. Cumplido el tiempo, las células fueron recuperadas por medio de centrifugación a 7,000g por 10 min. La pastilla fue resuspendida en 25 mL de agua estéril y agitada en vortex por 1 min. El paso de centrifugación se repitió y las células fueron congeladas en hielo seco y almacenadas a -70 para su posterior uso. Las células destinadas a la extracción de RNA fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C o usadas inmediatamente.

#### 8.5. Extracción de RNA

Con la finalidad de comprobar que el DNA del vector transformante tuviera la capacidad de expresar transcritos funcionales, se procedió a preparar RNA poliadenilado a partir de levaduras transformadas expresando el gen de interés. El RNA total de células inducidas por 24 h y congeladas en nitrógeno líquido fue extraído usando la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi en 1987. Partiendo de 50 mL de YPD, se obtuvieron entre 0.7 y 1 g de pastilla húmeda. La pastilla de células congeladas fue

pulverizada en mortero, el cual fue previamente atemperado con nitrógeno líquido, al igual que el pistilo. El polvo fino resultante fue transferido a un homogenizador de vidrio y resuspendido en 1 mL de solución D (tiocianato de guanidina al 4 M, citrato de sodio al 25 mM pH 7, sacrosyl al 0.5% y  $\beta$ -mercaptoetanol a 100 mM, éste último agregado justo antes de trabajar) por 100 mg de pastilla húmeda. Tras homogenizar por 3-5 min, el homogenizado fue transferido a un tubo de polipropileno y se agregaron en orden los siguientes reactivos: 100  $\mu$ L de acetato de sodio al 2M, pH 4, 1 mL de fenol saturado con agua DEPC y 200  $\mu$ L de cloroformo-álcohol isoamílico (49:1). La suspensión final fue agitada vigorosamente por 20 s e incubada a 4°C por 15 min. Tras la incubación, el tubo fue centrifugado a 10,000g por 20 min y la fase acuosa recuperada cuidadosamente, la cual fue transferida a otro tubo al que se le agregó 1 mL de isopropanol frío y tras mezclar adecuadamente se dejó en incubación a -20°C por 1 h. El RNA se empastilló tras centrifugar a 10,000g a 4°C por 20 min. La pastilla fue resuspendida en 300  $\mu$ L de solución D y precipitada con un volumen de isopropanol frío durante 1 h a -20°C. El RNA fue empastillado esta vez utilizando 14,000g por 15 min a 4°C. La pastilla fue lavada con etanol al 70% y disuelta en agua DEPC. Se separaron dos alícuotas de 1  $\mu$ L y los tubos fueron congelados en hielo seco. Las alícuotas separadas fueron usadas para cuantificar al espectrofotómetro y para correr en un gel de agarosa-formaldehído para verificar su integridad. La electroforesis en gel de agarosa-formaldehído fue efectuada tal y como se describe en la literatura (Sambrook *et al.*, 2000).

#### **8.5.1. Ensayo de protección de la RNasa (RPA)**

Con la finalidad de detectar el RNA que codifica para el gen de interés, se procedió a realizar un ensayo de protección de la RNasa (RPA, por sus siglas en inglés),

para lo que se usó el estuche comercial RPA III de Ambion. Una colonia de *S. cerevisiae* sin transformar, así como de levaduras transformadas fueron usadas para sembrar 50 mL de medio YPD y cuando se alcanzó una densidad óptica de 0.8, se tomó una muestra de 5 mL y al resto se le agregó  $\text{CuSO}_4$  a una concentración final de 1 mM. Para el caso de *P. pastoris*, el proceso se repitió como se describió antes, con la diferencia de que el medio usado fue el BMMY (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, buffer de fosfatos al 100 mM, pH 6.0, YNB al 1.34 % y biotina al  $4 \times 10^{-5}$ ) y la inducción se llevó a cabo usando metanol al 1%. Se tomaron 5 mL cada hora durante las 3 primeras horas y posteriormente a las 24 y 48 h. El medio conteniendo las levaduras fue centrifugado y las pastillas resuspendidas en sorbitol 1M, al cual se le agregaron 50 U de zimolasa (Zymo Research, cat# E1001) para producir esferoplastos y se extrajo el RNA con el método descrito a partir de la adición de la solución D. Se recuperaron aproximadamente 40  $\mu\text{g}$  de RNA de buena calidad para cada muestra. Para obtener la sonda radioactiva, se sintetizó RNA complementario usando como templado el vector pAV111 digerido con la enzima *Pst*I y modificado con el fragmento Klenow para hacer romos los extremos y empleando el estuche Ribomax descrito antes, pero esta vez utilizando la T3 RNA polimerasa, junto con rUTP marcado con  $^{32}\text{P}$ . Las cpm emitidas por el radioisótopo de la sonda se midieron en un contador de centelleo Beckman LS-230. Por cada muestra se usaron 15  $\mu\text{g}$  de RNA total y  $7 \times 10^4$  cpm de sonda y como controles se indujeron 2 tubos conteniendo sonda pero sin RNA. Las muestras se hibridaron toda la noche a  $42^\circ\text{C}$ , después de una breve incubación a  $95^\circ\text{C}$  para romper las estructuras secundarias. Al día siguiente, se agregó un cóctel conteniendo RNasa A y RNasa T1, excepto a uno de los controles, y se incubó por 30 min. Transcurrido este tiempo, se agregó una solución para inactivar RNasas y se agregaron 5  $\mu\text{g}$  de RNA acarreador. El

RNA protegido se precipitó y se corrió en un gel de poliacrilamida con urea, el cual fue expuesto a una película radiográfica Hyperfilm (Amersham, cat # RPN6K) adecuada para emisores beta y usando una pantalla amplificadora. El gel se expuso a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 15 h y se procedió a revelar la placa.

### 8.5.2. Purificación de RNA poliadenilado

La purificación del RNA poliadenilado fue llevada a cabo usando el estuche Oligotex de Qiagen (cat# 70022), el cual proporciona la resina de oligo-dT y los reactivos adecuados para llevar a cabo una cromatografía de afinidad. Los mejores resultados que se pudieron obtener fueron usando la metodología conocida como "batch", en la que el RNA es incubado con la resina de oligo-dT y por medio de centrifugaciones se elimina el RNA no retenido. Un mg de RNA total fue resuspendido en 1 mL de buffer de acoplamiento (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5, SDS 0.1% y 500 mM NaCl) y se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de resina Oligotex (cada 10  $\mu\text{L}$  de resina es capaz de capturar 6  $\mu\text{g}$  de RNA poliadenilado). Se calentó por 3 min a  $70^{\circ}\text{C}$  para disociar las estructuras secundarias y posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 15 min para dar pie a la hibridación entre la cola de poli-A del RNA y la de oligo-dT de la resina, seguido de una centrifugación a 14,000 rpm por 2 min. El sobrenadante conteniendo el RNA no poliadenilado fue eliminado y la resina resuspendida en un mL de buffer de acoplamiento, el cual fue eliminado tras centrifugar como se describió antes. Este proceso fue repetido 2 veces y finalmente el RNA poliadenilado fue desprendido de la resina usando 100  $\mu\text{L}$  del mismo buffer de acoplamiento, pero sin NaCl. La suspensión fue calentada a  $70^{\circ}\text{C}$  por 1 min y centrifugada a 14,000 rpm

Inmediatamente. El sobrenadante fue colectado y precipitado con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol al 100%. La solución etanólica fue incubada a  $-70^{\circ}\text{C}$  por toda la noche y el RNA poliadenilado empastillado por medio de centrifugación a  $18,000g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 min. La pastilla fue resuspendida en 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de ribonucleasas, dividida en alícuotas y congelada inmediatamente. Una de las alícuotas fue usada para cuantificar al espectrofotómetro y para efectuar una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído. Este RNA fue utilizado para inyectar ovocitos.

#### 8.6. Preparación de membranas plasmáticas de levadura

Para comprobar que las levaduras tuvieran receptores funcionales, se procedió a preparar membranas plasmáticas para ser inyectadas a ovocitos de *X. laevis*. Para la preparación de membranas de levadura se siguió la metodología descrita por Camarasa y colaboradores en 1996. *S. cerevisiae* crecidas en medio YPD suplementado con  $\text{CuSO}_4$  a 1 mM por 2 días, fueron colectadas por medio de centrifugación a  $6,000g$  por 10 min en un tubo de polipropileno de 50 mL. Partiendo de 50 mL de YPD se obtuvieron entre 1 y 1.5 g de pastilla húmeda, la cual fue lavada con 25 mL de agua estéril y centrifugada nuevamente bajo las mismas condiciones. En el caso de *Pichia pastoris*, las células fueron crecidas en medio MMY por 5 días. La pastilla fue procesada inmediatamente o congelada en hielo seco. La pastilla fue resuspendida en 500  $\mu\text{L}$  de buffer de membranas (MOPS al 50 mM, EDTA al 1mM y DTT al 1 mM, pH 7.5) y se le agregaron perlas de vidrio de 425-600  $\mu\text{m}$  (Sigma, G9268 lavadas en HCl y horneadas a  $200^{\circ}\text{C}$  por 2 h) hasta 2 mm debajo del menisco. Las levaduras fueron lisadas por medio

de agitación en vortex por 30 s seguido de 30 s en hielo, por 5 min. Se agregaron 5 mL de buffer de membranas frío y se agitó brevemente en vortex. El tubo se centrifugó a 1,000g por 5 min y el sobrenadante fue recuperado cuidadosamente, colocado en un tubo fresco y adicionado con inhibidor de proteasas específico para levaduras (Sigma P8215) a razón de 50  $\mu$ L por cada gramo de pastilla húmeda y PMSF 1 mM y el tubo se colocó en hielo. El proceso fue repetido por lo menos tres veces hasta que se comprobó bajo el microscopio que más del 85% de las células estaban rotas. Los sobrenadantes fueron mezclados y centrifugados nuevamente a 1,000g por 5 min, el sobrenadante transferido a otro tubo y vuelto a centrifugar a 3,000g por 5 min. Las pastillas formadas fueron eliminadas y finalmente el sobrenadante fue centrifugado a 10,000g por 1 h. La pastilla fue resuspendida en 2 mL de buffer de membranas por cada gramo de pastilla húmeda. La suspensión fue aplicada a un gradiente de sacarosa disuelta en buffer de membranas con dos cojines, uno de 43% y uno de 53% y ultracentrifugada a 170,000g por 2 h en un rotor SW41Ti (Beckman) en una ultracentrífuga L8-70 (Beckman). Se recuperó la fracción encontrada en la interfase entre el 43% y el 53%, la cual fue diluida agregando 3 volúmenes de buffer de membranas frío. La suspensión fue centrifugada a 10,000g por 20 min y la pastilla resuspendida en agua si se iba a inyectar o en buffer de acoplamiento si iba a ser usada para purificar. En ambos casos si no se procesaba inmediatamente, la muestra se dividía en alícuotas, se congelaba en hielo seco y se almacenaba a -70°C.

### 8.7. Inmunodetección de la proteína recombinante.

La concentración de proteínas de la fracción de membranas fue determinada usando un estuche comercial (Coomassie Protein Assay Reagent, Cat# 1856209, Pierce). Entre 15 y 20  $\mu$ g de proteína diluidos en buffer de muestra 2X (Tris-Cl al 0.125 M, SDS al 4%, glicerol al 20%, DTT al 0.2 M y azul de bromofenol al 0.02%, pH 6.8) fueron hervidos por 5 min y depositados en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en un gradiente 3 -15% para mejorar la resolución de las bandas. Las soluciones requeridas para preparar un mini-gel con separadores de 0.75 mm de espesor se muestran en la tabla 2. El gradiente se logró utilizando un generador de gradientes de BioRad (modelo 385).

Para cada experimento se prepararon dos gels, uno para ser teñido con azul de Coomassie para visualizar las proteínas y otro para transferirlas a una membrana de nitrocelulosa, en la cual la inmunodetección se llevó a cabo.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la preparación de un mini-gel en gradiente 3-15%.

Soluciones	15 %	3%
Buffer Tris 1.5 M pH 8.8 (4X)	500 $\mu$ L	---
Buffer Tris 0.5 M pH 6.8 (4X)	---	1250 $\mu$ L
Glicerol	400 $\mu$ L	---
Acrilamida 30% (Acril:Bis 29:1)	1000 $\mu$ L	500 $\mu$ L
SDS (10%)	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L
PSA 10%	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED	1 $\mu$ L	5 $\mu$ L

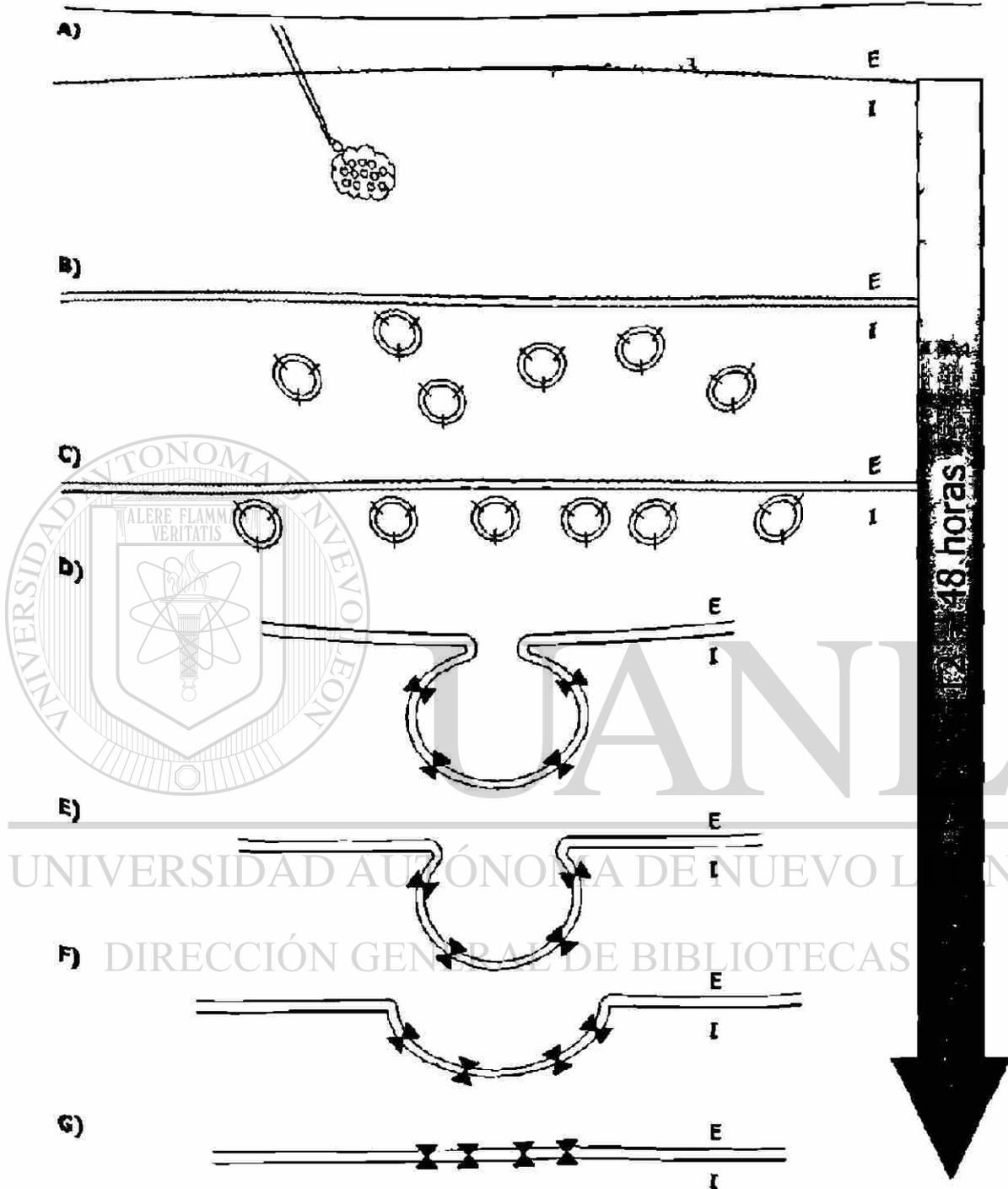
Los gels fueron corridos a 45 mA constantes por 80 min usando una cámara Mini-Protean (BioRad) en buffer de corrida (Tris a 25 mM, glicina a 190 mM y SDS al 0.1%). Transcurrido el tiempo de corrimiento, un gel fue fijado en metanol 50%, ácido

acético al 10% por 30 min y teñido en una solución de azul de Coomassie comercial (BioRad, Coomassie stain solution, cat# 161-0436) por 45 min. El exceso de coloración se removió usando una solución de metanol al 7% y ac. acético al 5% hasta que desapareció la mayoría del fondo. El otro gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa BioTraceNT (Pall-Gelman, cat# 66485) usando una corriente constante de 295 mA por 100 min en buffer de transferencia (Tris al 25 mM, glicina al 190 mM y metanol al 20%). Un marcador de peso molecular de proteínas pre-teñido (Invitrogen, Benchmark Prestained Protein Ladder, cat# 10748-010) fue usado como control de la transferencia. La membrana fue colocada en solución bloqueadora (BSA al 5% en TBS: Tris al 50 mM, NaCl al 150 mM, pH 7.4) por 30 min, tras los cuales se agregó el primer anticuerpo correspondiente: cuando se detectó  $\rho 1$ , el anticuerpo usado fue anti-GABA $\rho 1$  (N-19) desarrollado en cabra (Santa Cruz, cat# sc-21336) a una dilución de 1:200; para detectar la GFP se usó el anticuerpo anti-GFP desarrollado en conejo (ABR, cat# PA1-980) a una dilución de 1:1,000. El 1<sup>er</sup> anticuerpo fue incubado con agitación leve por 12 h a temperatura ambiente en un recipiente sellado con parafilm para evitar evaporación. La solución conteniendo el 1<sup>er</sup> anticuerpo fue guardada a -20°C y reutilizada hasta tres veces. La membrana fue brevemente enjuagada con TBS frío y fue incubada con el segundo anticuerpo diluido en solución bloqueadora por 10 h. Los segundos anticuerpos fueron adquiridos en Sigma (anti-cabra A-8062 y anti-conejo A-0418), ambos conjugados con fosfatasa alcalina y se usaron en diluciones desde 1:1,000 hasta 1: 50,000. Tras la incubación la membrana fue lavada con 15 mL de Tween 20 al 0.05% en TBS por 10 min, tres veces. Luego fue incubada brevemente en una solución alcalina (Tris al 0.1 M, NaCl al 0.1 M, pH 9.5) y las bandas inmunoreactivas reveladas

usando las tabletas SigmaFast (B-5655), las cuales contienen los sustratos de la fosfatasa alcalina 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro azul tetrazolillo (BCIP/NBT).

### **8.8. Inyección de RNAm y membranas plasmáticas de levadura.**

Tres  $\mu\text{L}$  de RNA poliadenilado a una concentración de 1 mg/mL fueron colocados en papel parafilm y aspirados a una aguja usando el microinyector neumático. El procedimiento para la preparación de los ovocitos y la microinyección es el mismo descrito arriba. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo entre los 4 y 7 días post-inyección. Por su parte, una muestra conteniendo 3  $\mu\text{L}$  de membranas a una concentración de 2-3 mg/mL fue sonicada por 5 s, incubada en hielo por 5 s y el proceso repetido 3 veces. La muestra fue brevemente centrifugada y depositada en un papel parafilm para posteriormente ser inyectada a ovocitos como ya se describió. El registro electrofisiológico se llevó a cabo entre 1 y 5 días post-inyección (Figura 9).



**Figura 9. Microtransplante de membranas.** Receptores embebidos en vesículas membranales son microinyectados en el ovocito (A). En el transcurso de 12 a 48 h (B a G), las vesículas migran hasta la membrana del ovocito donde se incorporan de manera funcional. En este punto, pueden ser estudiadas sus propiedades electrofisiológicas. (X) Receptores. (E) Espacio extracelular. (I) Espacio intracelular.

### 8.9. Modificación del péptido líder de la proteína $\rho$ 1

Con la finalidad de intentar mejorar la expresión del receptor GABA $\rho$ 1, se modificó el péptido líder de tipo silvestre del receptor, reemplazándolo por uno nativo de levadura. Para esto se utilizó el programa computacional SignalP V2.0.b2 (Nielsen y colaboradores, 1997), el cual predice la existencia de péptidos líder y su probable sitio de corte en una secuencia aminoacídica dada. Se escogió la proteína de membrana plasmática de levadura YBR296C, la cual es presuntamente una fosfato-permeasa localizada en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Martínez y Persson, 1998), puesto que las señales previamente reportadas (Ste2, 18 aa en Talmont *et al.*, 1996; Factor alpha, 89 aa en Weiss *et al.*, 1995, 1998; Schiller *et al.*, 2000, 2001; Pho1, 23 aa en Weiss *et al.*, 1995; Abdulaev *et al.*, 1997) al ser fusionadas con el receptor  $\rho$ 1 no eran cortadas eficientemente en el programa computacional SignalP V2.0.b2, es decir, que eran cortadas antes o después del residuo 16 del gen  $\rho$ 1, el cual marca el principio del receptor maduro. Por esa razón, se probaron varias señales de proteínas de membrana de *S. cerevisiae* hasta que se encontró YBR296C, cuyo péptido líder (21 aa) al ser usado para reemplazar el nativo de la molécula del humano y tras agregar los residuos aminoacídicos generados por el sitio de restricción fue removido eficientemente según el programa computacional SignalP V2.0.b2, dejando el receptor maduro sin ningún residuo agregado o eliminado. Se diseñaron un par de iniciadores que flanquearan el péptido líder hasta 30 pb río arriba y que introdujeran sitios de restricción que permitieran la subclonación en el vector de expresión. El polipéptido de 21 residuos aminoacídicos que presuntamente codifica para el péptido líder de la proteína de membrana plasmática YBR296C se denominó S2.

### 8.9.1. Retrotranscripción (RT-PCR)

Se extrajo RNA total de *S. cerevisiae* y se aisló el RNA mensajero como se describió antes, mismo que se usó como templado para la RT-PCR. La secuencia de los iniciadores fue la siguiente: 5' ttttactagtaatcaatataaacaagattaagcaaaaatg 3' (Spe5') conteniendo en su secuencia el sitio de restricción *Spe I* y 5' ttttgcattgcatcacaataacatggc 3' (Sph3'), el cual posee el sitio *Sph I*. La RT-PCR se llevó a cabo usando el estuche comercial Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche, cat# 1 939 823), el cual proporciona los reactivos e inhibidores de RNasas para llevar a cabo una reacción de RT-PCR en un solo tubo. Las condiciones para la RT-PCR se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de RT-PCR.

Componente	Concentración final
Agua estéril	-
dNTP's	0.2 mM cada uno
DTT	5 mM
Inhibidor de RNasas	0.1 U/ $\mu$ L
Iniciador 5'	0.4 $\mu$ M
Iniciador 3'	0.4 $\mu$ M
RNA poliadenilado	10 ng / $\mu$ L
Buffer RT-PCR 5X	1X
Enzimas (AMV RT, <i>Taq</i> y <i>Tgo</i> polimerasas) 50X	1X

Nota: volumen final de la reacción= 50  $\mu$ L.

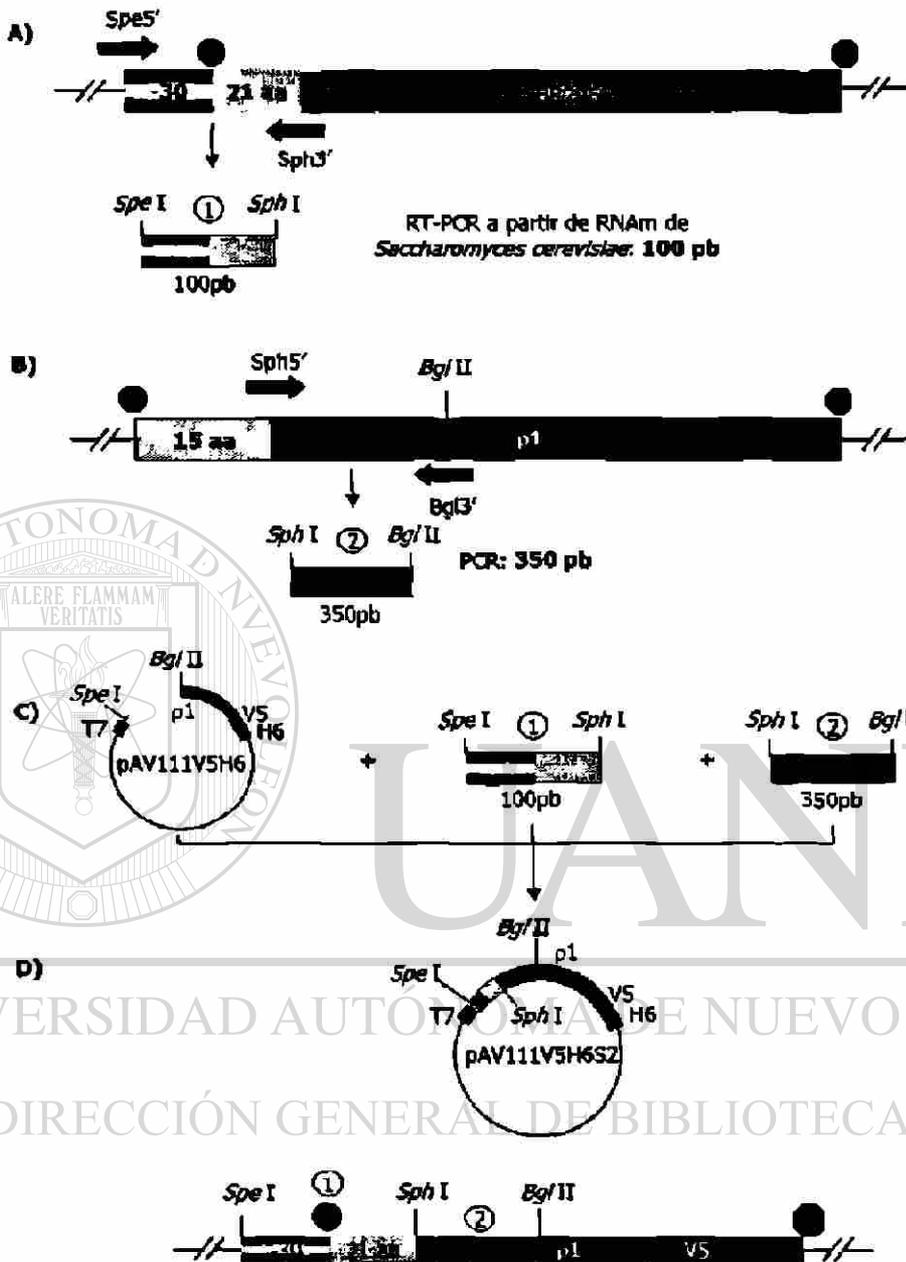
El programa utilizado en el termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4. Programa utilizado para la RT-PCR**

	PASO	TEMP	TIEMPO
1	Retrotranscripción	50°C	30 min
2	Desnaturalización inicial	94°C	2 min
3	Desnaturalización	94°C	30 s
4	Apareamiento	50°C	30 s
5	Extensión	68°C	45 s
6	Ir al paso 3 10 veces		
7	Desnaturalización	94°C	30 s
8	Apareamiento	50°C	30 s
9	Extensión modificada	68°C	45 s (agregar 5 s a cada ciclo)
10	Ir al paso 7 25 veces		
11	Extensión final	68°C	7 min
12	Fin		

### 8.9.2. Subclonación

Un par de iniciadores fueron diseñados para agregar un sitio de restricción al gen  $\rho 1$  y así poder eliminar el péptido silvestre para reemplazarlo con el nuevo péptido. La secuencia de los iniciadores para modificar el gen  $\rho 1$  es la siguiente: 5' ttttgcatgacgactgaaagcagaatgcactggcccg 3' (*Sph*5'), el cual contiene el sitio de restricción *Sph* I y 5' gaccacagatcttcttgaccacgccc 3' (*Bgl*3') el cual contiene un sitio de restricción *Bgl* II único para facilitar la subclonación. Las condiciones de la PCR así como el programa utilizado son los mismos descritos en la Tabla 1. Estos iniciadores se usaron para realizar una PCR usando el vector pAV111 como templado. El fragmento generado en la RT-PCR fue digerido con las enzimas *Spe* I y *Sph* I, mientras que el producto de la PCR fue digerido con las enzimas *Sph* I y *Bgl* II. El vector pAV111V5H6 fue digerido a su vez con las enzimas *Spe* I y *Bgl* II y los tres fragmentos fueron ligados y transformados para dar lugar al vector pAV111V5H6S2 (Figura 10).



**Figura 10. Modificación del péptido líder.** A) RT-PCR a partir de RNAm de levadura produjo un fragmento de 100 pb (①) codificando para el péptido señal del gen de levadura y 30 pb río arriba, al que se le introdujeron sitios de restricción para facilitar su clonación. B) Una PCR mutagénica se llevó a cabo para modificar el gen  $\rho 1$ , produciendo un fragmento de 350 pb con un sitio *Sph*I en el extremo 5' (②). C) Los fragmentos de la PCR mutagénica y de la RT-PCR fueron digeridos y ligados con el esqueleto de pAV111V5H6 digerido con las enzimas *Spe*I y *Bgl*II, para dar lugar al vector pAV111V5H6S2, el cual tiene el gen  $\rho 1$  modificado con la señal de *S. cerevisiae* (D). ● Codón de Inicio. ● Codón de terminación.

El vector pAV111V5H6S2 fue utilizado como templado para sintetizar RNAc *in vitro*, el cual fue microinyectado como ya se describió, para comprobar que la modificación del péptido señal no perjudicara la capacidad del receptor de incorporarse a la membrana plasmática y producir un receptor funcional.

La modificación de los vectores de expresión de levaduras se llevó a cabo por medio de subclonaciones. Para modificar el vector pPIC9 $\rho 1$ , el vector pAV111V5H6S2 fue digerido con *Spe I*, los extremos hechos romos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa y digerido con *Bgl II*; por su parte el vector pPIC9 $\rho 1$ GFPV5H6 fue digerido con *Bam HI*, los extremos hechos romos y posteriormente digerido con *Sac II*.

El fragmento de pAV111V5H6S2 y el esqueleto de pPIC9 $\rho 1$ GFPV5H6 fueron purificados y usados en una reacción de ligación. El vector obtenido fue el vector pPIC9 $\rho 1$ GFPV5H6S2.

Para modificar los vectores de expresión de *S. cerevisiae*, pYEXBX $\rho 1$ GFPV5H6, se digirió con *Eco RI* y *Bam HI*, al igual que el vector pPIC9 $\rho 1$ GFPV5H6S2. El fragmento

liberado por este último fue ligado con el esqueleto del primero y el vector resultante fue denominado pYEXBX $\rho 1$ GFPV5H6S2. El vector pYEXBX $\rho 1$ V5H6 fue digerido con las

enzimas *Bgl II* y *Sac II* de igual manera que el vector pYEXBX $\rho 1$ GFPV5H6S2, el cual se usó como esqueleto y al reemplazar el extremo 3' del gen con el fragmento generado con la digestión de pYEXBX $\rho 1$ V5H6, el vector obtenido se denominó pYEXBX $\rho 1$ V5H6S2.

Una vez obtenidos los vectores modificados, se procedió a secuenciar, transformar e inducir la expresión como ya se describió. Se aisló RNAm para ser microinyectado a los ovocitos y muestras de membranas fueron sometidas a electroforesis e inmunodetección, para comparar los niveles de expresión obtenidos contra los generados en la expresión del receptor portando el péptido líder humano nativo.

## 8.10. Imágenes en microscopio confocal

Para visualizar la distribución del receptor expresado en proteína de fusión con la GFP se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss Meta 510. Las levaduras expuestas al inductor tras dos días en el caso de *S. cerevisiae* y tres días en el caso de *P. pastoris*, fueron inmovilizadas en un portaobjetos de vidrio tras mezclar 3  $\mu$ L de suspensión de células con 3  $\mu$ L de agarosa al 2% disuelta en agua y cubiertos con un cubreobjetos. El microscopio se ajustó para inducir la excitación a 488 nm, utilizando un rayo láser emitido por una lámpara de argón y se utilizó un objetivo de Inmersión en aceite 63X. El software utilizado para el procesamiento de las imágenes fue Zeiss LSM Image Browser versión 3,2,0, 115.

## 8.11. Purificación del receptor

En este trabajo se escogió emplear cromatografía de afinidad, para lo que se escogieron los ligandos GABA, TPMPA y la resina de Níquel acoplado al ácido nitrilotriacético (Ni-NTA), para así tomar ventaja del epítipo de polihistidinas agregado al receptor en el extremo carboxilo.

### 8.11.1. Acoplamiento del ligando en matrices activadas

En el caso de GABA y TPMPA fue necesario acoplar las moléculas a una resina activada. Para GABA se escogió la matriz activada con bromuro de cianógeno (Sigma C9210). El proceso para acoplar el ligando se siguió como lo sugiere Sigma en la información de su producto. Brevemente, GABA se disolvió en buffer de acoplamiento

( $\text{NaHCO}_3$  al 0.1 M,  $\text{NaCl}$  al 0.5 M, pH 8.3-8.5) a razón de 5-10 mg por mL de resina. El proceso se llevó a cabo usando una columna de poliestireno desechable de BioRad. La resina fue lavada en  $\text{HCl}$  al 1 mM usando 200 mL por g de gel seco. La resina se lavó con 5 – 10 vol de agua destilada y posteriormente con 5 mL de buffer de acoplamiento por g de resina seca e inmediatamente se agregó el buffer de acoplamiento conteniendo el ligando. El fondo de la columna se selló con papel parafilm, al igual que la parte superior y se mezcló con agitación durante toda la noche a 4°C. Se eliminó el buffer conteniendo el ligando no acoplado y la columna se lavó con 10 vol de buffer de acoplamiento. Los grupos sin reaccionar se bloquearon usando glicina al 0.2 M pH 8 en buffer de acoplamiento por 2 h a temperatura ambiente. Se lavó extensivamente con buffer de acoplamiento pH 8.5 y luego con buffer de acetato (0.1 M, pH 4) adcionado con  $\text{NaCl}$  al 0.5 M. El ciclo de lavados con buffer de alto y bajo pH se repitió 5 veces. La resina se almacenó en  $\text{NaCl}$  al 1 M a 2-8 °C con azida de sodio al 0.02% hasta su uso. Para la columna de TPMPA se escogió una resina que tuviera un brazo espaciador. Se escogió la resina activada con grupos epoxy- de Sigma (E6632) y el ligando se acopló acorde a las sugerencias del proveedor. Diez mg de TPMPA fueron disueltos en 5 mL de buffer de acoplamiento (carbonato sódico al 0.1 M conteniendo 50% dimetilformamida, pH 11) y se le agregaron 0.3 g de resina. La mezcla fue incubada con agitación a 37°C por 16 h. Los grupos activos remanentes se bloquearon usando etanolamida a 1 M por 4 h y el gel se lavó extensivamente con buffer de acoplamiento seguido de una serie de lavados con buffers de alto y bajo pH (buffer de borato al 0.1 M,  $\text{NaCl}$  al 0.5 M, pH 8 y buffer de acetato al 0.1 M,  $\text{NaCl}$  al 0.5 M, pH 4). La columna se almacenó a 4°C en presencia de azida de sodio 0.02%. La resina de níquel se adquirió lista para usar en Qiagen (cat# 30210).

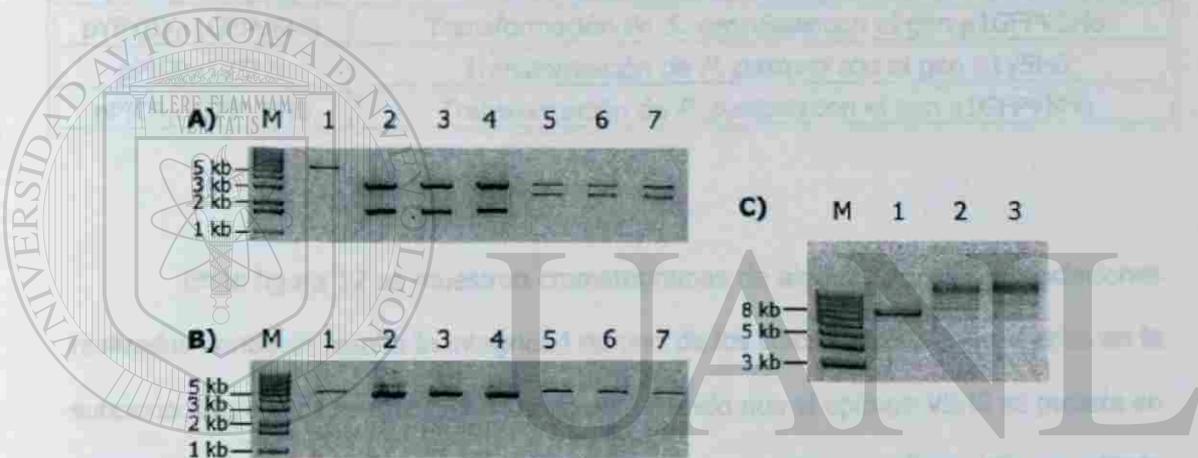
### 8.11.2. Cromatografía

Con la finalidad de purificar una proteína de membrana, es necesario solubilizar las proteínas previamente utilizando un detergente débil no-iónico, eliminar el material no solubilizado y eluir la muestra por una columna. Se siguió la metodología descrita por Weiss y Grisshammer (2002) con algunas modificaciones. Cuando se usaron las matrices de GABA y TPMPA, las membranas preparadas como se describió antes, fueron resuspendidas en un buffer de Bis-Tris al 50 mM, ácido 6-aminocaproico a 0.75 M y Triton X-100 a 0.1% y se incubaron por 30 min en hielo. Se utilizaron 5 mL de buffer para solubilizar las membranas por cada g de pastilla húmeda. Las membranas solubilizadas fueron eluidas por la columna, y se procedió a lavarla con 10 mL de buffer. Para eluir, se utilizó GABA a 100 mM en el mismo buffer y se colectaron fracciones de 500  $\mu$ L, las cuales fueron sometidas a electroforesis e inmunodetección para localizar la proteína de interés. En el caso de las proteínas modificadas para portar el epítope de polihistidinas, membranas solubilizadas con buffer Ni-NTA (HEPES a 50 mM, NaCl a 200 mM, glicerol a 30%, ácido 6-aminocaproico a 0.75 M y Triton X-100 al 1%) fueron incubadas en hielo por 30 min y ultracentrifugadas 30 min a 100,000g en un rotor SW55Ti para eliminar el material no solubilizado. El sobrenadante se transfirió a un tubo de propileno de 15 mL y se le agregaron 0.1 mL de resina pre-equilibrada en buffer Ni-NTA. La mezcla se incubó por 2 h a 4°C con agitación leve y se transfirió a una columna desechable de poliestireno. Se recolectó la muestra y se lavó la columna con 100 vol de buffer Ni-NTA adicionado con imidazol al 10 mM. Las proteínas unidas a la matriz se eluyeron con buffer Ni-NTA adicionado con imidazol al 500 mM en fracciones de 500  $\mu$ L, las cuales fueron sometidas a electroforesis e inmunodetección.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Construcción y secuenciación de los vectores

En la figura 11 se muestra el proceso de ligación y caracterización de algunos de los vectores construidos. Siempre se verificaron los sitios de reconocimiento de las enzimas que se usaron para la subclonación, para comprobar que el sitio estuviera íntegro, así como al menos dos enzimas de restricción con más de un sitio de corte.



**Figura 11. Caracterización de los vectores.** Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio mostrando algunos de los vectores construidos. A) Caracterización de los vectores pAV111V5H6 y pAV111 $\rho$ 1GFP con la enzima *Sac* II. El carril 1 muestra el vector pAV111 digerido con *Sac* II linearizado, mientras que los carriles 2 - 4 clonas candidatas a vector pAV111V5H6 digerido con *Sac* II, liberando dos bandas, ya que la modificación agregó un sitio. Los carriles 5 -7 muestran candidatas a vector pAV111GFPV5H6 también digeridos con *Sac* II, revelando la segunda banda de mayor tamaño en comparación con pAV111V5H6, pues se añade la secuencia que codifica para la GFP. B) Mismos DNAs usados en el gel anterior, pero esta vez digeridos con *Pfl* MI, la cual los lineariza. Se puede apreciar la diferencia de tamaño entre los tres vectores, siendo pAV111V5H6 menor, pues se eliminaron cerca de 500 pb al extremo 3' no codificable presentes en pAV111. Esto demostró que el sitio *Pfl* MI usado en la estrategia de subclonación se mantuvo íntegro. C) Resultados típicos de una ligación. El carril 1 muestra el esqueleto del vector pYEX-BX $\rho$ 1 digerido con *Bgl* II y *Kpn* I, mientras que los carriles 2 y 3 muestran este mismo DNA tras ser ligado con los fragmentos provenientes de pAV111V5H6 y pAV111GFPV5H6, respectivamente (ver Figura 7). En los tres geles se usó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder de GIBCO BRL (cat # 10787-018).

En la tabla 5 se muestra la lista de vectores que fueron construidos, así como el uso que se les dio.

**Tabla 5. Vectores construidos.**

Vector	Uso
pIZ $\rho 1$ V5H6	Poner en fase el epítopo V5H6 con el gen $\rho 1$
pIZ $\rho 1$ GFPV5H6	Poner en fase el epítopo V5H6 con el gen $\rho 1$ GFP
pAV111V5H6	Síntesis de RNAc del gen $\rho 1$ V5H6
pAV111GFPV5H6	Síntesis de RNAc del gen $\rho 1$ GFPV5H6
pYEXBX $\rho 1$ V5H6	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con el gen $\rho 1$ V5H6
pYEXBX $\rho 1$ GFPV5H6	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con el gen $\rho 1$ GFPV5H6
pPIC9 $\rho 1$ V5H6	Transformación de <i>P. pastoris</i> con el gen $\rho 1$ V5H6
pPIC9 $\rho 1$ GFPV5H6	Transformación de <i>P. pastoris</i> con el gen $\rho 1$ GFPV5H6

En la figura 12 se muestran cromatogramas de algunas de las secuenciaciones realizadas donde se resalta la integridad de uno de los sitios de restricción usados en la subdonación, el cual se mantuvo intacto, permitiendo que el epítopo V5H6 se pusiera en fase de lectura con el gen del receptor. También se muestra el epítopo H6, importante para la purificación con columna de níquel y el codón de terminación.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 9.2. Síntesis y microinyección de RNAc y registros electrofisiológicos

#### en ovocitos

Para comprobar que la adición del epítopo V5H6 no afectara la actividad biológica del receptor, se sintetizó RNA *in vitro*, el cual fue inyectado en ovocitos para caracterizar los receptores modificados. El rendimiento de una reacción de dos horas fue

aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  suspendidos en 30  $\mu\text{L}$  y separados en alícuotas de 3  $\mu\text{L}$ , cuya concentración fue ajustada a 1 mg/mL antes de la inyección.

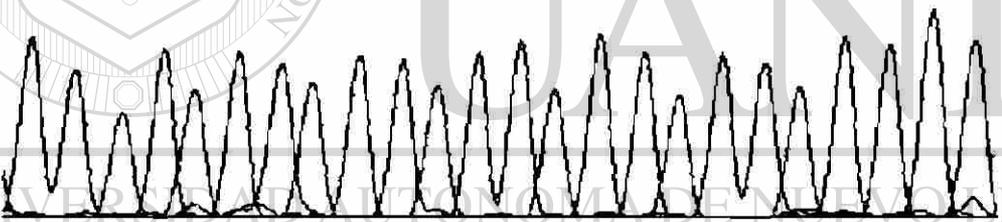
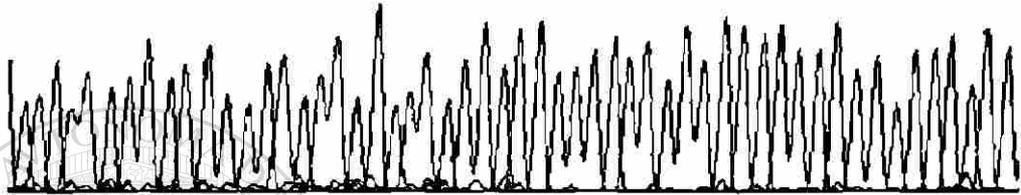


Figura 12. Secuenciación de los vectores. La figura A muestra la secuenciación del vector pAV111GFPVSH6 y la región donde la proteína GFP se fusiona con el epítipo V5 tras la ligación usando el sitio *Sac II*. El sitio se mantuvo intacto así como el marco de lectura. La figura B muestra el epítipo H6 en el vector pAV111VSH6 seguido del codón de terminación.

La potencia de expresión de los RNAs sintetizados con el estuche RiboMax mostró mucha variación, ocasionando que el mismo DNA usado como templado generara algunas veces RNAs que produjeron altas corrientes y otras veces bajas; sin embargo, en la mayoría de los experimentos se obtuvieron corrientes que pudieron ser caracterizadas adecuadamente. En la figura 13 se muestra la caracterización

electrofisiológica de los receptores portando el epítipo V5H6. Las corrientes generadas por los receptores producidos por estas construcciones mostraron un comportamiento electrofisiológico comparable con su contraparte nativa.

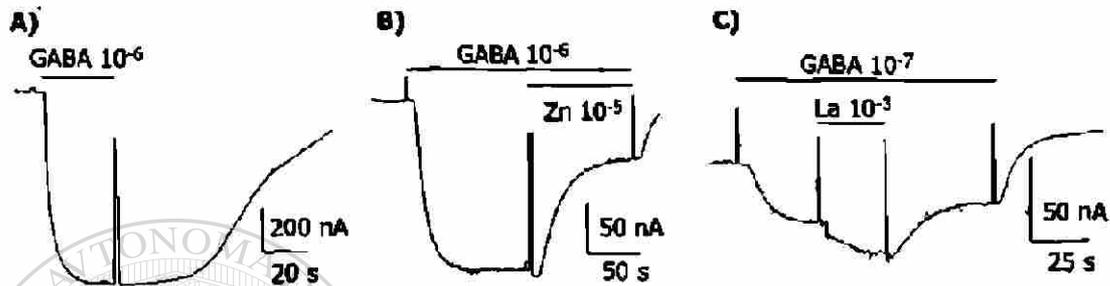
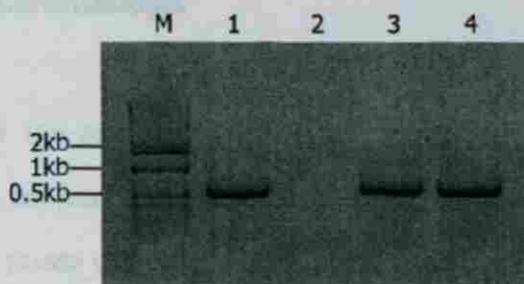


Figura 13. Caracterización electrofisiológica del receptor portando el epítipo V5H6. Ovocitos Inyectados con RNAc a partir de la construcción pAV111V5H6 mostraron una respuesta a GABA típica del receptor silvestre (A); además, el uso de inhibidores como el Zinc (B) y de potenciadores como el Lantano (C), también modularon las respuestas como se esperarían para el receptor silvestre.

### 9.3. Transformación de levaduras y confirmación de la integración

Cientos de colonias crecieron en placas deficientes de uracilo cada vez que se transformaron las levaduras *S. cerevisiae* con el método descrito. El control negativo nunca mostró crecimiento. De igual manera, *P. pastoris* fue transformada eficientemente y el control negativo nunca desarrolló colonias cuando la mezcla de transformación fue crecida en una placa deficiente de histidina.

PCRs realizadas a los DNAs obtenidos de las colonias crecidas en medio deficiente mostraron fragmentos con los tamaños esperados cuando se utilizaron iniciadores específicos para detectar el gen p1 a partir de DNA genómico de *S. cerevisiae* (Figura 14).



**Figura 14. Confirmación por PCR en *S. cerevisiae*.** Utilizando un par de iniciadores específicos para el gen  $\rho 1$ , se realizó una PCR usando DNA de levaduras transformadas y sin transformar. El carril 1 muestra el control positivo, usando el plásmido pAV111 como templado. El carril 2 muestra el control negativo, es decir, usando DNA genómico de levadura sin transformar. En el carril 3 se usó DNA genómico de levaduras transformadas con el gen  $\rho 1$ , mientras que en el carril 4, en la reacción de PCR se usó DNA genómico de levaduras transformadas con el gen  $\rho 1GFP$ . Todas las reacciones que resultaron positivas generaron un fragmento del mismo tamaño, pues los iniciadores se aparean dentro del gen  $\rho 1$ , produciendo un fragmento de 507 pb, consistente con lo esperado.

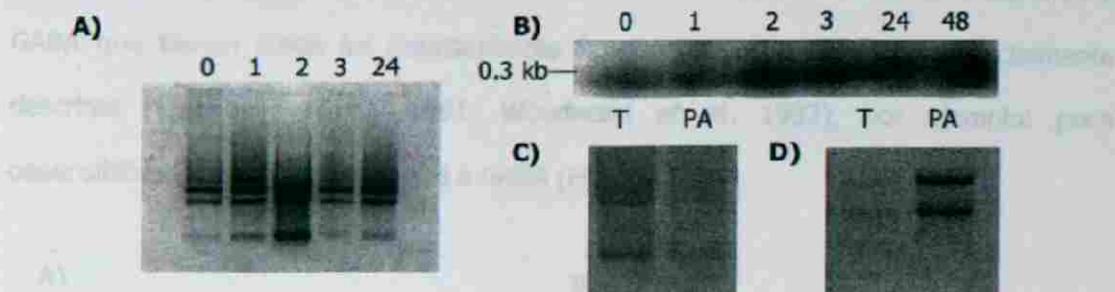
En la figura 15 se muestra la confirmación por PCR de la transformación de las levaduras *P. pastoris*. Aunque se pudo confirmar que las levaduras fueron transformadas eficientemente y que la secuenciación de los vectores mostró que los genes estaban íntegros, nunca se logró detectar la proteína tras la inducción de la expresión.



**Figura 15. Confirmación por PCR en *P. pastoris*.** Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio en el que se muestran los fragmentos de tamaño esperado tras la PCR a las colonias de *Pichia pastoris* transformadas con los genes  $\rho 1$  y  $\rho 1GFP$ . Los carriles 1 - 3 muestran los resultados obtenidos usando el vector pPIC9 $\rho 1GFP$  como templado, usando diferentes combinaciones de iniciadores para abarcar toda la extensión del gen y se obtuvieron los mismos tamaños en los fragmentos en los carriles 4 - 6, en los que se usaron como templado DNA genómico a partir de levaduras transformadas con dicho plásmido. Los carriles 7 - 10 muestran los fragmentos obtenidos tras usar DNA genómico de levadura transformada con el plásmido pPIC9 $\rho 1$ , mostrando diferencias en los tamaños de los productos debido a la falta del gen de fusión GFP. El carril 10 muestra el control negativo, en el que se usó DNA genómico de levadura sin transformar e iniciadores específicos para el gen  $\rho 1$ .

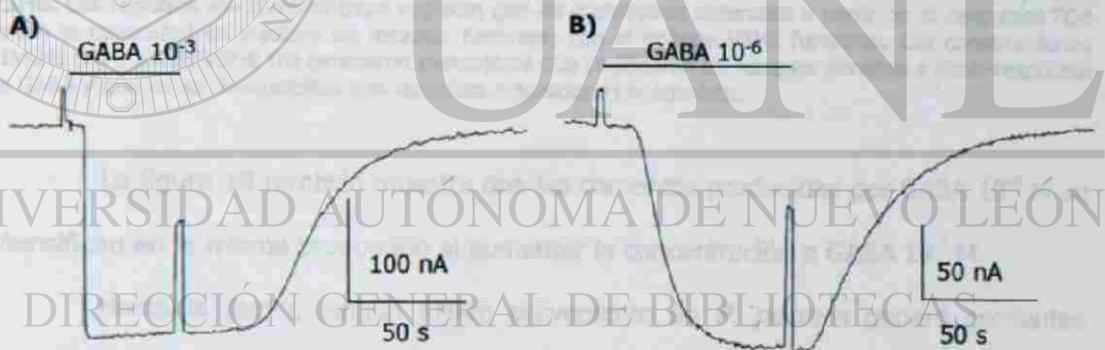
#### 9.4. Extracción de RNA, purificación y microinyección del poliadenilado y electrofisiología

En la figura 16A se muestra un gel conteniendo los RNAs de la levadura *S. cerevisiae* obtenidos, así como los resultados de la separación de los poliadenilados. En esa misma figura se puede observar la auto-radiografía obtenida en el experimento de RPA, el cual demostró que el RNA extraído a partir de levaduras transformadas con el gen  $\rho 1$  contenía especies provenientes de este gen. Una pequeña señal fue detectada incluso a las 0 horas, sugiriendo que el promotor no es estrictamente regulado o que algún metal en cantidades traza en el medio de cultivo lo está activando, sin embargo, el incremento con el paso del tiempo es evidente (Figura 16B). Solo los RNAs extraídos a partir de *S. cerevisiae* resultaron positivos en los ensayos de RPA, *P. pastoris* siempre mostró resultados negativos. Partiendo de un gramo de levaduras el rendimiento fue de alrededor de 1.5 mg de RNA total, el cual fue utilizado para obtener el RNA poliadenilado. Partiendo de un mg de RNA total, el rendimiento fue generalmente entre 20 y 30  $\mu\text{g}$  de RNA poliadenilado, el cual fue resuspendido a una concentración de 1 mg/mL y microinyectado (Figura 16C y D).



**Figura 16. Extracción de RNA, RPA y aislamiento de poliadenilados.** A) Gel de agarosa-formaldehído mostrando RNAs extraídos de levaduras a diferentes horas post-inducción. B) Autoradiografía del experimento de RPA en la que se muestra el tamaño del fragmento de  $\rho 1$  protegido, así como el incremento de señal con el paso del tiempo. C) RNA total (T) y poliadenilado (PA) extraído de *S. cerevisiae* visualizados en un gel de agarosa-formaldehído. Los resultados fueron similares cuando la extracción se realizó a partir de *P. pastoris* (D).

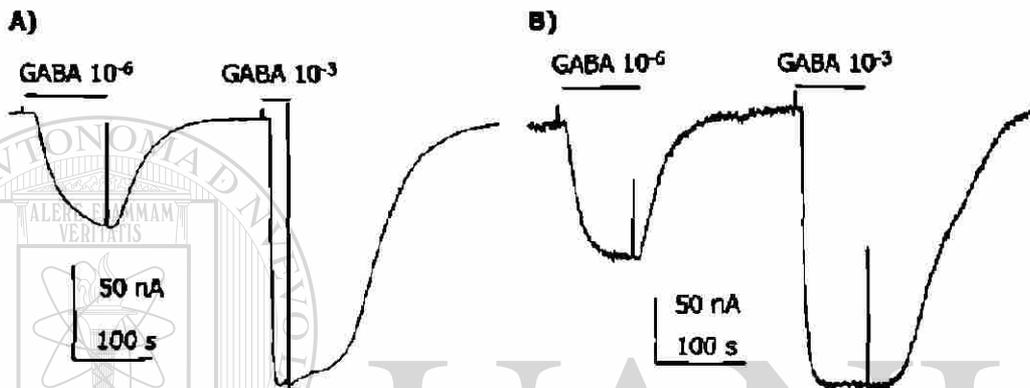
En la figura 17 se muestra un registro electrofisiológico obtenido posterior a la inyección del RNAm en ovocitos.



**Figura 17. Inyección de mensajeros de levadura.** La figura muestra los registros obtenidos tras la inyección de mensajeros provenientes de *S. cerevisiae* TD4 transformada con el gen  $\rho 1$  (A) y  $\rho 1GFP$  (B).

En la figura 18 se muestran mensajeros obtenidos de las levaduras expresando el transgen con el epítipo de fusión V5H6. Se pudo comprobar que las respuestas generadas fueron las típicas de un receptor nativo a pesar de la modificación del gen.

Los distintos mensajeros expresados por las levaduras con los transgenes de fusión  $\rho 1V5$  y  $\rho 1GFPV5H6$  al ser inyectados en los oocitos expresaron receptores a GABA que tienen todas las características funcionales de los receptores inicialmente descritas (Poienzani *et al.*, 1991; Woodward *et al.*, 1992), por ejemplo: poca desensibilización y alta sensibilidad a GABA (Figs 17 y 18).



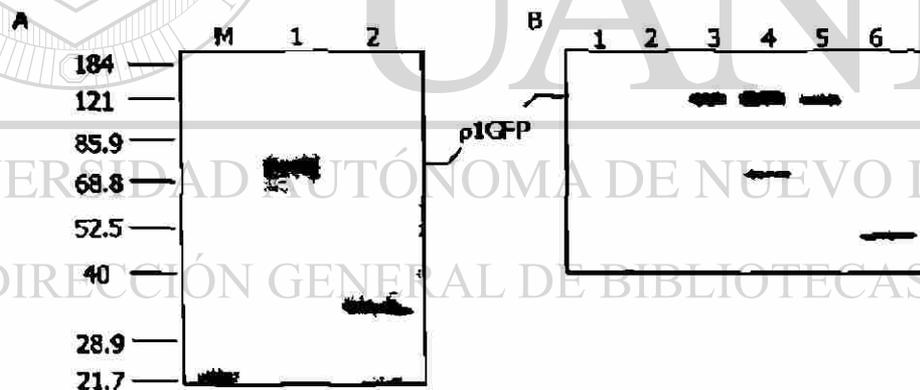
**Figura 18.** Mensajeros de levaduras transformadas con el receptor fusionado con el epítoto V5H6. Los registros electrofisiológicos sugieren que los mensajeros obtenidos a partir de *S. cerevisiae* TD4 tenían la capacidad de traducir un receptor fusionado con el epítoto V5H6 funcional. Las construcciones  $\rho 1V5H6$  (A) y  $\rho 1GFPV5H6$  (B) generaron mensajeros que codificaron un receptor sensible a dosis-respuesta de GABA y que no se desensibiliza tras repetidas exposiciones al agonista.

La figura 18 también muestra que las corrientes producidas por GABA 10<sup>-6</sup> M se intensifican en la misma proporción al aumentar la concentración a GABA 10<sup>-3</sup> M.

Hasta la fecha, ningún RNAm proveniente de *P. pastoris* generó corrientes detectables al ser microinyectados.

### 9.5. Preparación de membranas de levadura, inmunodetección y registros electrofisiológicos

En la figura 19 se muestra un gel SDS-PAGE con membranas obtenidas a partir de levaduras transformadas con el transgen  $\rho 1$ GFP transferido a una membrana de nitrocelulosa expuesta al anticuerpo anti-GFP para su inmunodetección, así como los pasos seguidos en el proceso de preparación de membranas plasmáticas. Se puede apreciar que la mayor parte de la proteína se encontró en la interfase esperada, sin embargo, una parte no fue retenida en la interfase y se depositó en forma de pastilla en el fondo del tubo, indicando que no toda la proteína se encuentra ensamblada en la membrana plasmática.



**Figura 19. Membranas de levadura e inmunodetección.** A) Una preparación de membranas crudas a partir de *S. cerevisiae* TD4 transformadas con el gen  $\rho 1$ GFP muestra reacción a una altura aproximada de 80kD (1) y mientras que el carril de la derecha (2) muestra el control positivo para la inmunodetección (50 ng de GFP purificada). B) Pasos en la purificación de las membranas plasmáticas. En todos los carriles se usaron 25  $\mu$ L de muestra a partir de 1) 25 mL de sobrenadante tras la centrifugación para obtener las membranas crudas. 2) 25 mL de homogenizado total a partir de 400 mL de medio de cultivo. 3) 1 mL membranas crudas. 4) Interfase 43-53 del gradiente de sacarosa (200  $\mu$ L) 5) Pastilla del colchón de sacarosa 53% (500  $\mu$ L). El carril 6 muestra 50 ng de GFP purificada.

A juzgar por la intensidad de la señal generada por 50 ng de GFP purificada, se puede calcular que en 25  $\mu\text{L}$  de interfase la cantidad de receptor es aproximadamente 100 ng. Ya que la interfase fue resuspendida en 200  $\mu\text{L}$ , se puede deducir que la cantidad de proteína obtenida en el experimento fue de 800 ng en total. Tomando en cuenta que el experimento se realizó a partir de 400 mL de medio de cultivo, se deduce que el rendimiento es de aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  de proteína por litro de medio de cultivo.

En la figura 20 se muestra un registro electrofisiológico resultante de la inyección de membranas plasmáticas de levadura. Los mejores registros no lograron pasar de los 5 nA tras repetidas inyecciones. Esto indica que: a) las membranas no tienen mucho receptor incorporado; b) tienen mucho, pero no todos son funcionales; c) las membranas de levadura no se incorporan eficientemente a la membrana del ovocito; d) la proteína está siendo degradada en el proceso de ruptura de la pared celular.



**Figura 20. Inyección de membranas de levadura.** Repetidas inyecciones de preparaciones de membranas plasmáticas no lograron generar respuestas mayores de 5 nA. Estas pequeñas respuestas, sin embargo, estaban ausentes en ovocitos control sin inyectar.

Algunas preparaciones de levadura generaron respuestas oscilatorias "espontáneas" en los ovocitos, como se muestra en la figura 21. Estos resultados sugieren la existencia de algún canal de iones en la levadura, que probablemente aun

no ha sido descrito. Sin embargo, al no formar parte de los objetivos de la tesis, no se le dio seguimiento.

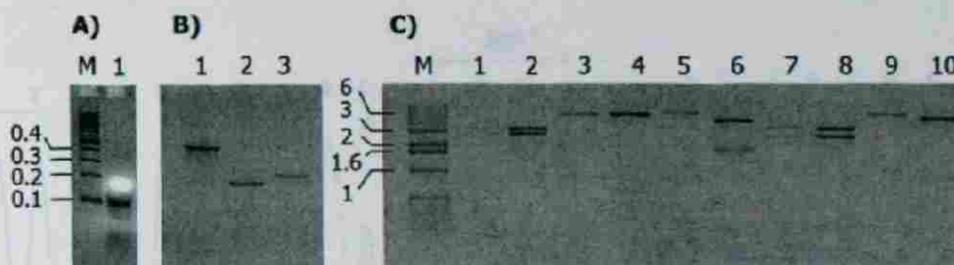


**Figura 21. Corriente oscilatoria espontánea.** Este fenómeno fue encontrado tras inyectar membranas de levadura, sugiriendo que membranas intactas lograron transplantarse en la membrana plasmática del ovidito. Esta corriente estaba ausente en los oviditos control, por lo que pudiera ser la respuesta generada por algún canal de iones de levadura que aún no haya sido caracterizado.

Ninguna preparación de membranas proveniente de *P. pastoris* generó corrientes tras ser inyectadas a oviditos, ni los "Western blots" mostraron inmunoreacción alguna.

#### 9.6. Substitución del péptido líder de la proteína $\rho 1$

En la figura 22 se muestra el proceso por el que se obtuvo la modificación del péptido señal. Primeramente se muestra el resultado de la RT-PCR, la cual produjo un fragmento de 100 pb consistente con lo esperado. Se muestra la purificación de los fragmentos de PCR para introducir los sitios de restricción, así como el vector digerido con las enzimas de restricción apropiadas.



**Figura 22. Modificación del péptido señal.** El primer paso consistió en realizar una RT-PCR para amplificar el fragmento correspondiente a la presunta señal de la proteína YBR296C. En A) se muestra el resultado de la RT-PCR donde se obtuvo un fragmento de 100 pb, consistente con lo esperado. El marcador de peso molecular es una escalera de 100 pb, y la primera banda corresponde a ese tamaño. En B) se muestra el vector pAV111V5H6 digerido con las enzimas *Spe* I y *Bgl* II (1), el fragmento de 100 pb digerido con *Spe* I y *Sph* I (2) y el fragmento de 350 pb digerido con *Sph* I y *Bgl* II purificados y listos para ligar (ver Figura 10). Los vectores obtenidos tras la ligación fueron caracterizados utilizando enzimas de restricción cuyos sitios hubieran sido perdidos o ganados tras la modificación. En C) se muestra un gel de la caracterización del vector pAV111GFPV5H6S2 (2, 4, 6, 8 y 10) comparado con el vector pAV111GFPV5H6 (1, 3, 5, 7 y 9) usando las enzimas *Spe* I/*Kpn* I en el caso de 1 y 2, *Not* I/*Bgl* II para 3 y 4, *Bam* HI para 5 y 6, *Sac* II para 7 y 8 y *Eco* RI para 9 y 10, obteniéndose los patrones esperados. Los tamaños de los marcadores están dados en kilobases.

En la tabla 6 se muestran los vectores obtenidos y el uso que se les dio.

**Tabla 6. Vectores construidos para la modificación del péptido señal.**

Vector	Uso
pAV1115H6S2	Síntesis de RNAc del gen $\rho$ 1V5H6 modificado con el péptido señal de la proteína YBR296C de levadura
pAV111GFPV5H6S2	Síntesis de RNAc del gen $\rho$ 1GFPV5H6 modificado con el péptido señal de la proteína YBR296C de levadura
pYEXBX $\rho$ 1V5H6S2	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con el gen $\rho$ 1V5H6 modificado con el péptido señal de la proteína YBR296C
pYEXBX $\rho$ 1GFPV5H6S2	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con el gen $\rho$ 1GFPV5H6 modificado con el péptido señal de la proteína YBR296C
pPIC9 $\rho$ 1GFPV5H6S2	Transformación de <i>P. pastoris</i> con el gen $\rho$ 1GFPV5H6 modificado con el péptido señal de la proteína YBR296C

En la figura 23 se muestra un segmento de la secuenciación del vector, la cual confirmó que la modificación introdujo el fragmento 5' del gen YBR296C y que los sitios de restricción utilizados mantuvieron el marco de lectura íntegro.

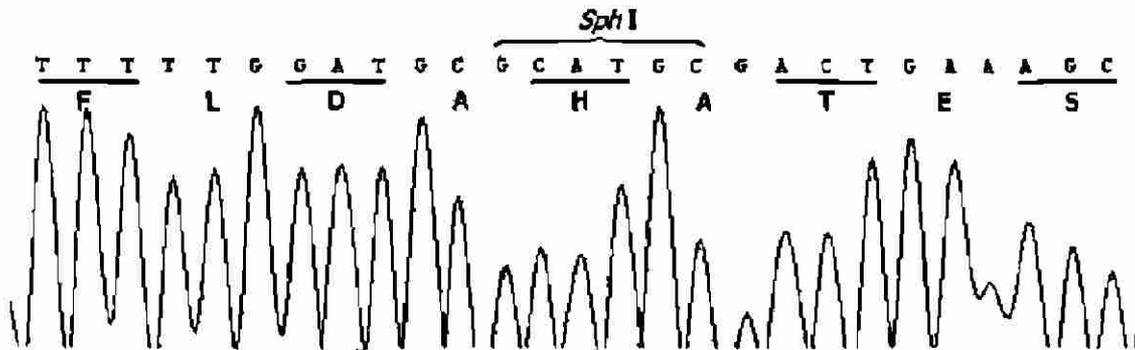


Figura 23. Secuenciación de la modificación para introducir el péptido S2. La figura muestra la secuenciación del vector pAV111SH6S2 donde se localiza el sitio de restricción *Sph*I íntegro, el cual une el fragmento S2 con el residuo aminoacídico 16 (T) del gen  $\rho 1$ .

La figura 24 muestra registros electrofisiológicos obtenidos de ovocitos inyectados con RNAc sintetizado a partir de la construcción pAV111GFPV5H6S2. Estos resultados comprueban que el DNA modificado con la secuencia S2 es capaz de producir un receptor funcional y que estos receptores tienen las propiedades características de los receptores expresados por el RNA de tipo silvestre.

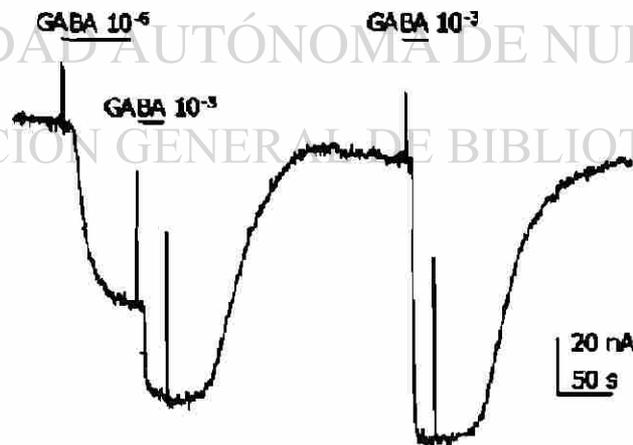
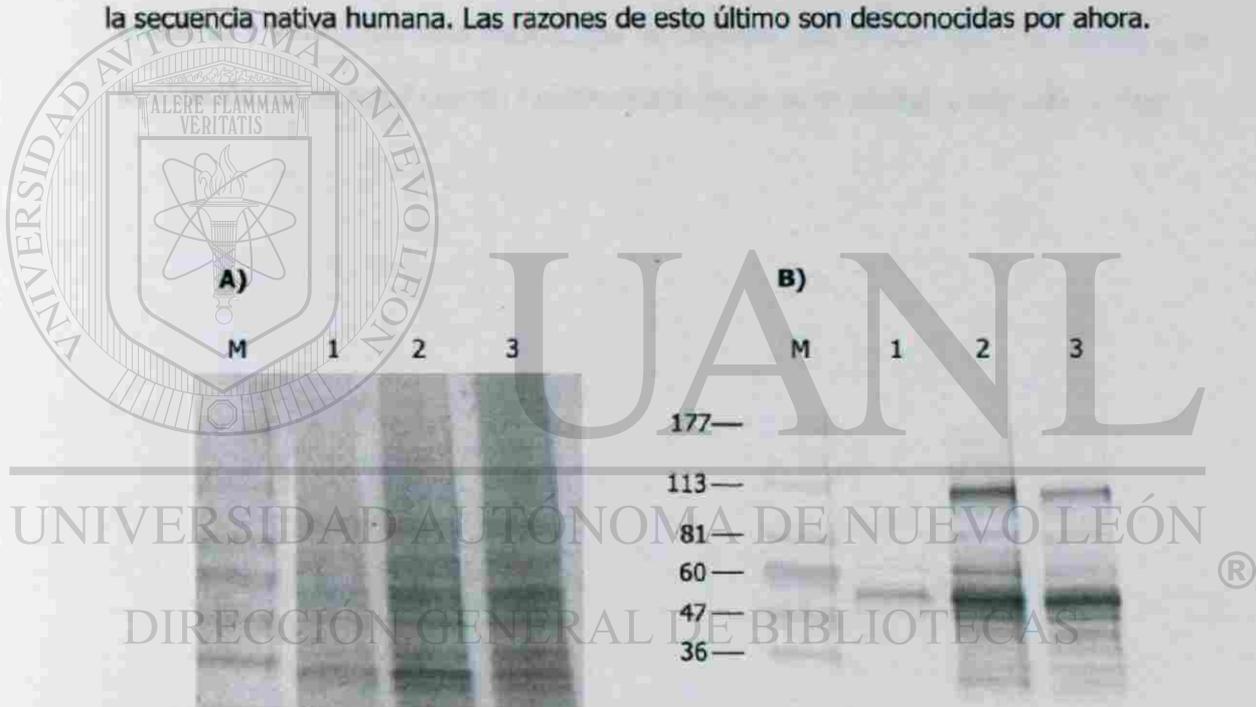


Figura 24. Electrofisiología en el receptor modificado con la secuencia S2. La figura muestra el registro obtenido a partir de un ovocito inyectado con RNAc sintetizado a partir del vector pAV111GFPV5H6S2. Los receptores expresados retuvieron las características típicas, tales como la sensibilidad a dosis-respuesta y su baja tasa de desensibilización.

### 9.7. Expresión en levaduras del receptor $\rho 1$ modificado con la secuencia S2

A juzgar por los resultados electrofisiológicos y por electroforesis e inmunodetección, como se muestra en la figura 25, las construcciones portando la secuencia S2 no resultaron en una mejora para expresar receptores funcionales. Los niveles de expresión del receptor no fueron necesariamente mejores a los obtenidos con la secuencia nativa humana. Las razones de esto último son desconocidas por ahora.



**Figura 25. Comparación de la expresión usando el péptido nativo humano y el péptido de levadura.** SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y su contraparte sometida a inmunodetección a partir de membranas crudas de levadura *S. cerevisiae* expresando el receptor  $\rho 1$ GFPV5H6 (2) y  $\rho 1$ GFPV5H6S2 (3). El carril 1 muestra el perfil de proteínas a partir de membranas crudas de *S. cerevisiae* sin transformar. El perfil de proteínas en el gel visualizado con azul de Coomassie (A) no mostró diferencias obvias y la inmunodetección comprobó que los niveles de producción se mantuvieron muy similares (B). La banda inmunoreactiva se muestra a una altura de alrededor de 100 KD puesto que el epítopo V5H6 agrega aproximadamente 13 KD y además porque la muestra tiene detergente, el cual retarda la migración. El barrido en los carriles de bandas aparentemente inespecíficas puede ser debido a un exceso de proteínas en el carril o por especies degradadas de la proteína de interés. El anticuerpo utilizado fue el anti-GABA $\rho 1$  (N-19) de Santa Cruz.

### 9.8. Imágenes al microscopio confocal.

En la figura 26 se muestran levaduras *S. cerevisiae* TD4 expresando la proteína de fusión  $\rho 1$ GFP, las cuales fueron sujetas a microscopia confocal. En esa misma figura se compara el patrón de fluorescencia mostrado por la proteína con el péptido humano nativo contra el receptor fusionado con el péptido de levadura (26A). La localización celular, a juzgar por la fluorescencia emitida por el receptor  $\rho 1$ GFPV5H6S2 expresado en levaduras y visualizado bajo microscopia de fluorescencia (Figura 26C), fue similar a la localización del receptor cuando fue expresado portando el péptido señal nativo (26B).



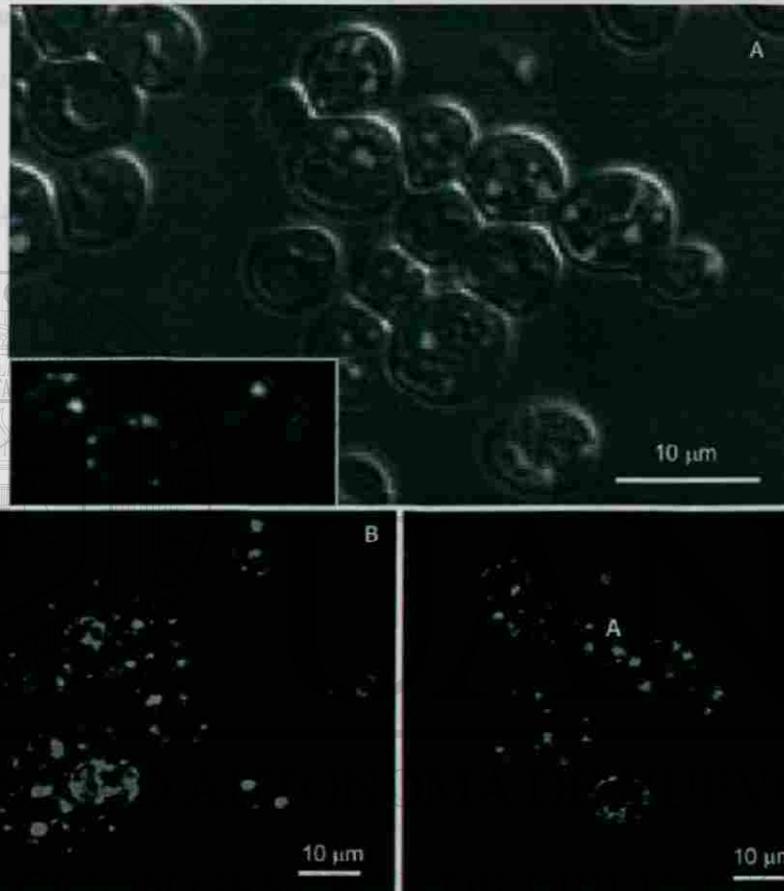
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

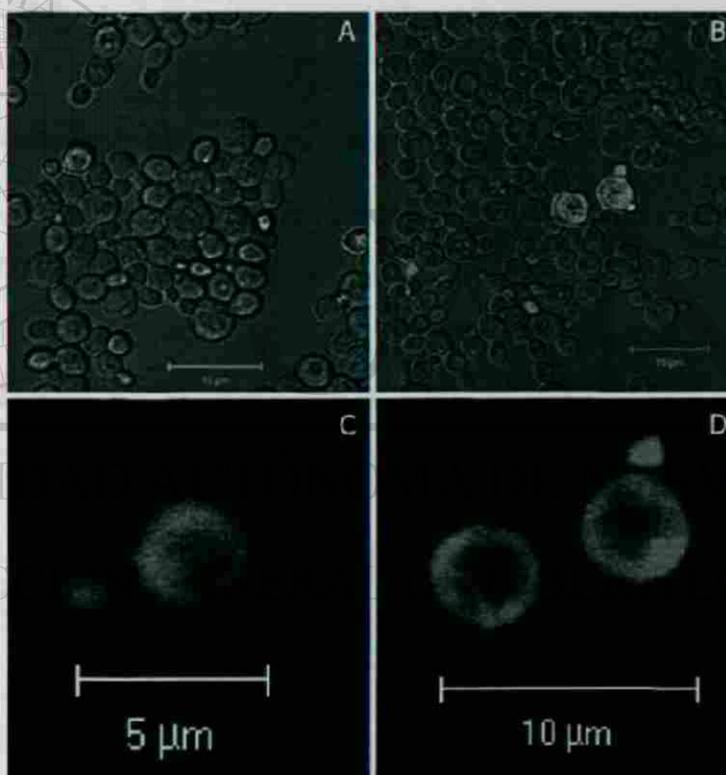


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 26. Fluorescencia en microscopio confocal.** A) Muestra una composición al sobreponer una imagen de contraste de fase con la fluorescencia generada por la GFP fusionada al receptor  $\rho 1$  expresadas en *S. cerevisiae* TD4 expuestas por 2 días al inductor. Se puede apreciar la distribución intracelular y que la mayor parte se encuentra en cuerpos de inclusión aparentemente insolubles, así como que algunas de las levaduras no fluorescen. Solo una pequeña parte de la fluorescencia está en la periferia, como se observa en el recuadro. En B) se muestra el patrón de fluorescencia obtenido al expresar el receptor con el péptido líder nativo humano. No existe una obvia diferencia con el patrón obtenido con las levaduras expresando el receptor modificado para portar el péptido S2 (C).

En cuanto a *P. pastoris*, solo cuando se usó microscopía confocal pudo apreciarse fluorescencia que indicara que el receptor estaba siendo expresado. Tanto las levaduras transformadas con el transgen  $\rho 1$ GFP, portando el péptido señal silvestre, como las levaduras transformadas con la versión modificada para portar la señal S2, mostraron fluorescencia (Fig 27). Sin embargo, la cantidad de levaduras fluoresciendo, fue menor a los resultados obtenidos con *S. cerevisiae*. Tal fluorescencia estuvo ausente en las levaduras transformadas con el gen  $\rho 1$  o en la cepa sin transformar.



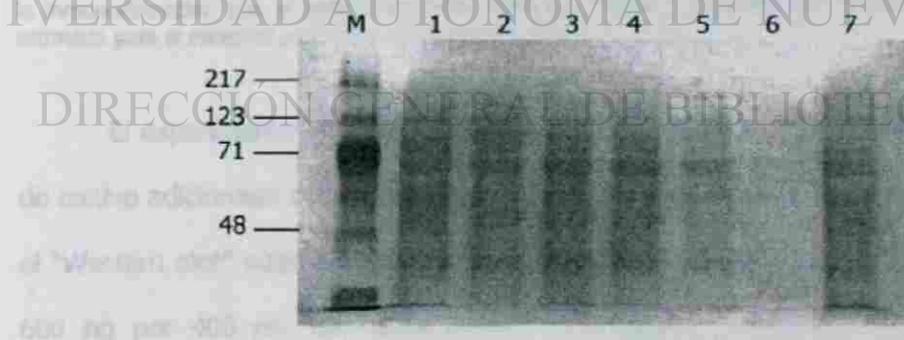
**Figura 27. *Pichia pastoris* y microscopía confocal** . Usando microscopía confocal pudo comprobarse que *P. pastoris* expresa el receptor fusionado a la proteína verde fluorescente. Levaduras transformadas con el plasmido pPIC9 $\rho 1$ GFPV5H6S2 (A), expuestas por 3 días al inductor, mostraron un patrón de fluorescencia similar al generado por levaduras transformadas con el vector pPIC9 $\rho 1$ GFP (B). Sin embargo, la cantidad de células fluoresciendo fue menor a la obtenida usando levaduras del género *Saccharomyces* (ver figura 26). C es un acercamiento de A para mostrar a mayor detalle la fluorescencia. D es un acercamiento de B.

## 9.9. Purificación del receptor.

Sólo cuando se utilizó la resina de Ni-NTA partiendo de proteínas expresadas por levaduras llevando los genes en fusión con el epítipo de polihistidinas, fue posible reconocer la proteína en el eluido en el tamaño correspondiente y con un notable porcentaje de pureza comparado con la muestra inicial. Sin embargo, partiendo de 1.5 g de levaduras inducidas (400 mL de medio de cultivo), el rendimiento fue de entre 800 y 1,000 ng de proteína con el tamaño esperado, lo que resulta en un rendimiento de 2.5  $\mu$ g por litro de cultivo.

### 9.9.1. Columnas con GABA y TPMPA como fase estacionaria

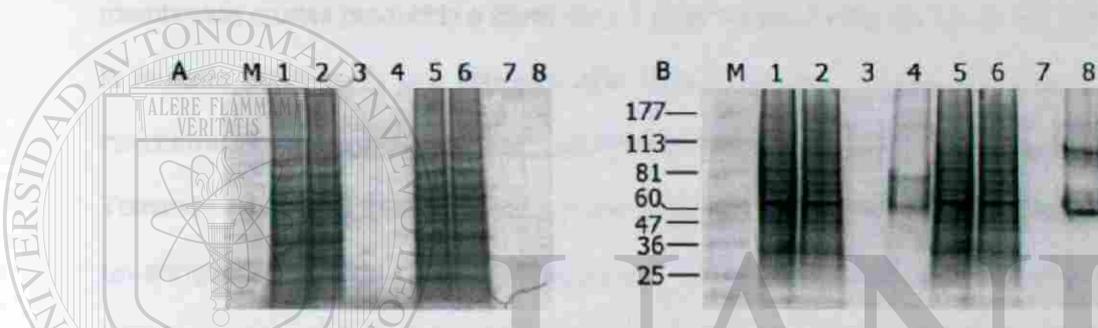
En la figura 28 se muestran los resultados de la purificación del receptor utilizando la columna de TPMPA. Cuando se utilizaron las columnas de GABA o TPMPA nunca se logró observar una separación de proteínas entre las diferentes fracciones.



**Figura 28. Cromatografía de afinidad usando la columna de TPMPA.** SDS-PAGE teñido con nitrato de plata mostrando las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad usando TPMPA como fase estacionaria para una muestra de membranas obtenidas a partir de levaduras expresando  $\rho$ 1GFP. El carril 1 muestra el eluido no retenido, 2-4 las fracciones correspondientes al lavado con buffer de acoplamiento, 5 y 6 fracciones conteniendo las proteínas eluidas al usar 100 mM GABA. El carril 7 corresponde a la muestra original. No se puede apreciar una separación verdadera entre las fracciones. Los resultados fueron similares cuando se usó GABA como fase estacionaria.

### 9.9.2. Columnas de Ni-NTA

Cuando la cromatografía se realizó utilizando Ni-NTA como fase estacionaria, se pudo observar una separación real entre las fracciones y el receptor eluyó en la fracción esperada y con un notable grado de pureza comparado con la muestra original. La figura 29 muestra los resultados obtenidos en un SDS-PAGE visualizado con azul de Coomassie y su réplica sometida a inmunodetección.



**Figura 29. Cromatografía de afinidad usando Ni-NTA como fase estacionaria.** Sacando provecho del epítipo H6 colocado en el extremo carboxilo del receptor, se pudo realizar cromatografía de afinidad usando Ni-NTA como fase estacionaria. En A se muestra un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie mostrando la separación obtenida tras la cromatografía a membranas de levadura expresando el receptor  $\rho$ 1V5H6 (1-4) y  $\rho$ 1GFPV5H6 (5-8). Los carriles 1 y 5 representan la muestra de membranas crudas original, 2 y 6 el eluido no retenido, 3 y 7 lavado extensivo con buffer de acoplamiento, 4 y 8 elución con 500 mM imidazol. A pesar de que la tinción con azul de Coomassie no revela la presencia de proteínas en el eluido, la inmunodetección con el anticuerpo anti-GABA $\rho$ 1 detecta proteínas que se encuentran a la altura estimada para el receptor  $\rho$ 1V5H6 y  $\rho$ 1GFPV5H6 (carriles 4 y 8 en B).

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El experimento se hizo a partir de las levaduras obtenidas en 400 mL de medio de cultivo adicionado con inductor por 2 días. La intensidad de la banda observada tras el "Western blot" sugiere unos 30 ng de receptor en 25  $\mu$ L de eluido, lo que significan 600 ng por 400 mL de medio cultivo, equivalente a 1.5  $\mu$ g por litro de cultivo. Resultados similares fueron obtenidos cuando se repitió el experimento. Una banda a la altura de poco menos de 50 kD se observa tanto en el eluido de  $\rho$ 1V5H6 como en el correspondiente a  $\rho$ 1GFPV5H6. Esto pudiera ser debido a una degradación posterior a la cromatografía en un sitio dentro del receptor  $\rho$ 1, cerca del extremo carboxilo, pues

para ser retenida por la columna el extremo carboxilo debe estar íntegro, pero para poder ser detectada en el "Western blot", el extremo amino debe estar intacto.

Cabe mencionar que estos experimentos se realizaron utilizando medio pobre para evitar que las levaduras alcancen una maduración de la pared celular muy pronto. Usando medio rico, con 400 mL se podría producir cerca de 4 g de levaduras, lo que resultaría en un incremento en la proteína recuperada, pero la ruptura de las células sería mas violenta provocando mayor degradación de las proteínas. La cantidad de membranas crudas producida a partir de 1.5 g de levaduras fue de 12.75 mg, por lo que la muestra inicial tenía una concentración de 4.25 mg/mL, resuspendido en 3 mL. La concentración de la muestra final, asumiendo 600 ng en 500  $\mu$ L, es de 1.2  $\mu$ g/mL. Tomando en cuenta que no se detectaron proteínas contaminantes, esto equivaldría a un enriquecimiento de cerca de 3500 veces; además, si consideramos que la muestra inicial estaba resuspendida en 3 mL y la muestra final en 0.5 mL, la muestra se concentró 6 veces. El resultado final del proceso de purificación es que la proteína se enriqueció en un factor de aproximadamente 21,000.

---

## 10. DISCUSIÓN

Las levaduras del género *S. cerevisiae*, en sus cepas DY150 y TD4 fueron capaces de expresar el receptor heterólogo GABA $\rho 1$ , así como las fusiones con la GFP. No se detectaron diferencias entre ambas cepas, aunque al ser observadas al microscopio de fluorescencia había una aparente diferencia en la cantidad de células fluoresciendo, siendo TD4 la que parecía tener un mayor porcentaje de células expresando la fusión  $\rho 1$ GFP. Por esa razón, la mayoría de los experimentos fueron efectuados usando la cepa TD4 como sistema expresor. La levadura *P. pastoris* en sus cepas GS115 y SMD1168 sólo mostró que el receptor fue expresado al usar el receptor GABA $\rho 1$  fusionado con la GFP y expuestas a microscopía confocal, pero la cantidad de células fluoresciendo fue menor a la obtenida usando *S. cerevisiae*. Esto pudiera explicar por qué las preparaciones de RNAm no generaron resultados positivos. Por esa razón, se abandonó el uso de *P. pastoris* y los esfuerzos se centraron exclusivamente en *S. cerevisiae*. Otros trabajos han demostrado que *P. pastoris* si es capaz de expresar proteínas de membrana heterólogas (Weiss *et al.*, 1995, 1998; Massou *et al.*, 1999; Schiller *et al.*, 2001, 2001; de Long *et al.*, 2004), lo que sugiere que experimentos más exhaustivos deberán realizarse con esta levadura si en un futuro se decide retomar este sistema para expresar el receptor GABA $\rho 1$ . En cuanto a proteínas de membrana expresadas en levaduras por otros grupos, los niveles de producción obtenidos se encuentran en un rango desde 0.02 pmol/mg de proteína de membrana para el receptor muscarínico humano (usando el péptido nativo humano en *S. cerevisiae*, Payette *et al.*, 1990) hasta 115 pmol/mg de proteína de membrana para la subunidad  $\beta 2$  del receptor adrenérgico humano (en *S. cerevisiae*, usando el péptido señal Ste2, King *et al.*, 1990). En el caso de *P. pastoris*, los niveles expresados están en un rango de entre 0.4

pmol/mg para el receptor  $\mu$  opioide humano (usando el péptido señal Ste2, Talmont *et al.*, 1996) y 25 pmol/mg para la subunidad  $\beta 2$  del receptor adrenérgico humano (usando la señal del Factor  $\alpha$ , Weiss *et al.*, 1998). Dichos niveles de expresión fueron calculados por medio de ensayos de radio-ligando, pero al traducirlos a g obtenidos, se convierten en, por ejemplo, 2.5  $\mu$ g por mg de membranas crudas por Weiss *et al.*, 1998. El rendimiento obtenido en este trabajo con *S. cerevisiae* fue de 0.047  $\mu$ g por mg de membrana cruda.

Los ensayos de microinyección con RNAm proveniente de levaduras transformadas con el receptor GABA $\rho 1$ , mostraron definitivamente que el RNA se encuentra enriquecido con la especie que codifica para el receptor, pues en ovocitos inyectados con ese RNAm se registraron corrientes de más de un  $\mu$ A. Además los ensayos de RPA mostraron bandas protegidas prominentes.

Sin embargo, los ensayos para identificar al receptor no mostraron que éste pudiera ser recuperado consistentemente de manera abundante. Los ensayos de

"Western Blot" detectaron la proteína en cantidades bajas y cuando preparaciones de membranas plasmáticas fueron inyectadas en los ovocitos, las corrientes producidas por GABA fueron pequeñas (2 – 5 nA). Los ovocitos nativos no generan corrientes al aplicar GABA, aun en concentraciones altas. Por otra parte, la cromatografía de afinidad utilizando el epítipo de polihistidinas ofreció un rendimiento de entre 1 – 3  $\mu$ g de receptor por litro de cultivo. Esto es consistente y puede ayudar a explicar por qué las repetidas inyecciones con diferentes preparaciones fallaron en producir corrientes considerables. Por ejemplo, cuando preparaciones provenientes de membranas plasmáticas del órgano eléctrico del pez torpedo, el cual está muy enriquecido con receptores nicotínicos, son inyectadas en ovocitos, éstos generan corrientes mayores a

1000 nA cuando son expuestos a acetilcolina (Marsal *et al.*, 1995). Cabe mencionar que la técnica de microtransplantación de membranas de diferentes tejidos a ovocitos de rana del género *Xenopus* nació hace años en el laboratorio del director externo de esta tesis, el Dr. Ricardo Miledi, y es un procedimiento de rutina en el mismo. Experimentos con esa misma técnica partiendo de otros tejidos (corteza cerebral de rata), usando los reactivos empleados en los experimentos de levaduras, consistentemente mostraron respuestas a canales iónicos presentes en el tejido y ausentes en los ovocitos (resultados no mostrados). Prueba de que las membranas pudieran estar siendo preparadas correctamente es la respuesta oscilatoria espontánea obtenida tras la inyección de las membranas de levadura. Esa respuesta no es natural en el comportamiento del ovocito nativo, sugiriendo que lo que estaba provocando ese fenómeno se originó por la inyección de membranas de levadura.

Otro punto que es importante hacer notar es la forma en que las levaduras son lisadas. Debido a la naturaleza fúngica de las levaduras, su pared celular es un impedimento para una ruptura sutil y subsecuente obtención de proteínas íntegras. La microscopía de fluorescencia usando *S. cerevisiae* expresando la proteína de fusión  $\rho 1$ GFP mostró que las levaduras comenzaban a expresar (fluorescer) entre los 2 ½ y 3 días, alcanzando su fase estacionaria (6 OD<sub>600</sub>), lo que desencadenaba una maduración de la pared celular. Todos los protocolos revisados en que se practica la ruptura de levaduras usando perlas de vidrio se recomendaba usar células que estuvieran en una OD<sub>600</sub> de 0.8-1 para poder romperlas eficientemente, evitando la degradación por calor o fuerza física generada tras los repetidos ciclos de agitación en vórtex con perlas de vidrio. Cuando se usaban células expuestas por 3 días al inductor cuya OD<sub>600</sub> estaba muy por encima de 1, siempre se necesitaron al menos 5 ciclos de 5 min para obtener

una ruptura de >85%. Por otro lado, cuando se usaron células con OD<sub>600</sub> menores 1 (cuando se extrajo RNA, una parte fue separada para probar la eficiencia de ruptura bajo el microscopio), sólo se necesitaron 3 ciclos de 3 min al vórtex para obtener >90% de las células rotas. Sin embargo, en este punto, las células aun no fluorescían. Con esto se abre la posibilidad de que el método de ruptura de las células contribuyera al pobre rendimiento obtenido.

La microscopía confocal mostró que una pequeña parte de la fluorescencia estaba posicionada en la periferia, revelando que parte del receptor producido puede ser dirigido eficientemente a la membrana, lo cual se confirma definitivamente con las respuestas a GABA tras microinyección de membranas de levadura. Sin embargo, la mayor parte se encontró en cuerpos de inclusión aparentemente insolubles.

La modificación del péptido señal dio como resultado un receptor completamente funcional, que retuvo las propiedades electrofisiológicas características del receptor nativo. Sin embargo, el péptido señal de levadura no fue capaz de mejorar los niveles de expresión, ni de dirigir más eficientemente la proteína a la membrana. Esto demostró que la falla del receptor para incorporarse a la membrana, o para ser sobreproducido a niveles mucho mayores a los obtenidos, no es debida al uso de un péptido líder proveniente de un mamífero incapaz de ser reconocido por una especie más primitiva, evolutivamente hablando.

Los resultados de la cromatografía sólo fueron exitosos cuando se usaron las construcciones del receptor modificado con el epítipo de polihistidinas y a pesar de lo eficiente de la metodología, solo unos pocos microgramos por litro de cultivo fueron capaces de ser recuperados, aunque con un buen grado de pureza comparado con la muestra inicial. Si se quisiera purificar este receptor aun más, técnicas como

cromatografía por exclusión de tamaño y concentración usando filtros con membranas de tamaño de poro conocido, podrían eliminar proteínas contaminantes; sin embargo, con tan baja producción, la muestra obtenida tendría poco valor para estudios estructurales.

## 11. CONCLUSIONES

Recapitulando los resultados obtenidos, todo parece indicar que las levaduras no son el sistema de expresión heterólogo más adecuado para la producción del receptor GABA $_C$   $\rho 1$ . Esto nos dice que investigaciones futuras necesarias para obtener el receptor GABA $_C$   $\rho 1$  en grandes cantidades deben orientarse a otros sistemas. Además se ha generado información útil sobre el sistema de purificación del receptor GABA $_C$   $\rho 1$  modificado para portar el epítipo de polihistidinas, ya que el sistema de buffers (sales, concentraciones de glicerol, detergente y porcentaje del mismo) que funciona con una proteína, no necesariamente funciona con otra. El sistema obtenido en esta tesis es el resultado de muchas pruebas y no está reportado en ningún artículo científico o publicación alguna. El sistema demostró funcionar para solubilizar la proteína, acoplarla a la columna, tolerar los lavados con concentraciones bajas de imidazol y eluir en una sola fracción usando altas concentraciones de imidazol. Ya que en el proyecto se generaron plásmidos para expresar en otros sistemas y éstos ya contienen la fusión con el epítipo de polihistidinas, podrán ser utilizados para intentar sobreexpresar el receptor usando otros medios y si alguno de ellos muestra ser capaz de expresarlo a un mejor nivel, el sistema de buffers para la purificación del receptor ya estará listo para ser implementado y se ahorrarán tiempo y recursos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulaev NG, Popp MP, Smith WC, Ridge KD. 1997. Functional expression of bovine opsin in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 10:61-9.
- Barnard EA, Miledi R, Sumikawa K. 1982. Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus oocytes*. *Proc R Soc B* 215: 241-6.
- Barnard EA, Sutherland M, Zaman S, Matsumoto M, Nayeem N, Green T, Darlison MG, Bateson AN. 1993. Multiplicity, structure, and function in GABAA receptors. *Ann N Y Acad Sci* 707:116-25.
- Bowery NG, Enna SJ. 2000. Gamma-aminobutyric acid (B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 292:2-7.
- Calvo DJ, Vazquez AE, Miledi R. 1994. Cationic modulation of the 1-type gamma-aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Proc Natl Acad Sci* 91:12725-9.
- 
- Camarasa C, Prieto S, Ros R, Salmon JM, Barré P. 1996. Evidence for a selective and electroneutral K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* 12:1301-13.
- Carpenter MK, Parker I, Miledi R. 1988. Expression of GABA and glycine receptors by messenger RNAs from the developing rat cerebral cortex. *Proc R Soc Lond B* 234:159-70.
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 13:329-32.

- Costa E, Guidotti A. 1996. Benzodiazepines on trial: a research strategy for their rehabilitation. *Trends Pharm Sci* 17:192-200.
- Cutting GR, Curristin S, Zoghbi H, O'Hara B, Seldin MF, Uhl GR. 1992. Identification of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho2 cDNA and colocalization of the genes encoding rho2 (GABRR2) and rho1 (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics* 12:801-6.
- Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino WB, Uhl GR, Kazazian HH. 1991. Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci* 88:2673-7.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
- de Jong LA, Grunewald S, Franke JP, Uges DR, Bischoff R. 2004. Purification and characterization of the recombinant human dopamine D2S receptor from *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 33:176-84.
- 
- Enna SJ, Bowery NG. 1997. The GABA receptors. 2ª Edición. The Human Press, Totowa, New Jersey, EUA. pp332.
- Enz R, Cutting GR. 1998. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* 38:1431-41.
- Fujita N, Nelson N, Fox TD, Claudio T, Lindstrom J, Riezman H, Hess GP. 1986. Biosynthesis of the *Torpedo californica* acetylcholine receptor alpha subunit in yeast. *Science* 231:1284-7.
- Gietz RD, RH Schiestl 1995, Transforming Yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. Vol 5; 255-69.

Gundersen CB, Miledi R, Parker I. 1983. Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc Roy Soc B* 219: 103-9.

Gundersen CB, Miledi R, Parker I. 1984. Messenger RNA from human brain induces drug- and voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* 308:421-4.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233:177-82.

Hang J, Shi H, Li D, Liao Y, Lian D, Xiao Y, Xue H. 2000. Ligand binding and structural properties of segments of GABA<sub>A</sub> receptor alpha 1 subunit overexpressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275:18818-23.

Hoedemaekers AC, van Breda Vriesman PJ, De Baets MH. 1997. Myasthenia gravis as a prototype autoimmune receptor disease. *Immunol Res.* 16:341-54.

King K, Dohlman HG, Thomer J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. Control of yeast mating signal transduction by a mammalian beta 2-adrenergic receptor and Gs alpha subunit. *Science* 250:121-3.

Johnston GA. 1981. GABA receptors. In: *The Role of Peptides and Amino Acids as Neurotransmitters*. New York: Liss. p. 1-17.

Johnston GA. 1996. GABAC receptors: relatively simple transmitter-gated ion channel? *Trends Pharm Sci* 17:319-23.

Lauren HB, Pitkanen A, Nissinen J, Soini SL, Korpi ER, Holopainen IE. 2003. Selective changes in gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits in the hippocampus in spontaneously seizing rats with chronic temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 349:58-62.

- Linder S, Schliwa M, Kube-Granderath E. 1996. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques* 20:980-2.
- Lipska BK, Lerman DN, Khaing ZZ, Weickert CS, Weinberger DR. 2003. Gene expression in dopamine and GABA systems in an animal model of schizophrenia: effects of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci* 18:391-402.
- Marsal J, Tlgyi G, Miledi R. 1995. Incorporation of acetylcholine receptors and Cl<sup>-</sup> channels in *Xenopus* oocytes injected with *Torpedo* electroplaque membranes. *Proc Natl Acad Sci* 92:5224-8.
- Martin IL and Dunn SM. 2002. GABA Receptors, *Tooris Reviews* No. 20.
- Martinez P, Persson BL. 1998. Identification, cloning and characterization of a derepressible Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 258:628-38.
- Martinez-Torres A, Demuro A, Miledi R. 2000. GABA $\rho$ 1/GABA $\alpha$ 1 receptor chimeras to study receptor desensitization. *Proc Natl Acad Sci* 97:3562-6.
- Martinez-Torres A, Vazquez AE, Panicker M, Miledi R. 1997. Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the GABA $\rho$ 1 receptor. *The Pharmacologist* 39: 54.
- Massou S, Puech V, Talmont F, Demange P, Lindley ND, Tropis M, Milon A. 1999. Heterologous expression of a deuterated membrane-integrated receptor and partial deuteration in methylotrophic yeasts. *J Biomol NMR* 14:231-9.
- Miledi R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B* 215:491-7.

- Miledi R, Duenas Z, Martinez-Torres A, Kawas CH, Eusebi F. 2004. Microtransplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 101:1760-3.
- Miledi R, Molinoff P, Potter LT. 1971. Isolation of the cholinergic receptor protein of Torpedo electric tissue. *Nature* 229: 554-7.
- Miledi R, Parker I, Sumikawa K. 1982. Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1:1307-12.
- Miledi R, Parker I, Sumikawa K. 1983. Recording of single  $\gamma$ -aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc Roy Soc B* 218:481-4.
- Miyazawa A, Fujlyoshi Y, Urwin N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423:949-55.
- Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA. 1994. Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* 62:815-8.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1-6.
- Ogurusu T, Shingai R. 1996. Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1305:15-8.
- O'Hara BF, Andretic R, Heller HC, Carter DB y Kilduff TS. 1995. GABAA, GABAC and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Brain Res Mol* 28:239-50.

- Olsen RW, Delgado-Escueta AV. 1999. Neuronal channels, receptors and transporters: molecular structure, gating, and pharmacology. Introduction *Adv Neurol* 79:437-40.
- Palma E, Trettel F, Fudle S, Renzi M, Miledi R, Eusebi F. 2003. Microtransplantation of membranes from cultured cells to *Xenopus* oocytes: a method to study neurotransmitter receptors embedded in native lipids. *Proc Natl Acad Sci* 100:2896-900.
- Payette P, Gossard F, Whiteway M, Dennis M. 1990. Expression and pharmacological characterization of the human M1 muscarinic receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 266:21-5.
- Polenzani L, Woodward RM y Miledi R. 1991. Expression of mammalian *g*-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 88:4318-22.
- Qian H, Dowling JE y Ripps H. 1998. Molecular and pharmacological properties of GABA<sub>A</sub> subunits from white perch retina. *J Neurobio* 37:305-20.
- Reilander H, Welss HM. 1998. Production of G-protein-coupled receptors in yeast. *Curr Opin Biotechnol* 9:510-7.
- Roscosky Jr, Robert. 1997. *Bloquímica*. 1a edición. McGraw-Hill Interamericana, México DF. pp417-41.
- Sander P, Grunewald S, Bach M, Haase W, Reilander H, Michel H. 1994. Heterologous expression of the human D2S dopamine receptor in protease-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Eur J Biochem* 226:697-705.
- Schiller H, Haase W, Molsberger E, Janssen P, Michel H, Reilander H. 2000. The human ET(β) endothelin receptor heterologously produced in the methylotrophic yeast

*Pichia pastoris* shows high-affinity binding and induction of stacked membranes: Receptors Channels 7:93-107.

Schiller H, Molsberger E, Janssen P, Michel H, Reilander H. 2001. Solubilization and purification of the human ETB endothelin receptor produced by high-level fermentation in *Pichia pastoris*. Receptors Channels 7:453-69.

Strata F, Cherubini E. 1994. Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development. J Physio 480:493-503.

Talmont F, Sidobre S, Demange P, Milon A, Emorine LJ. 1996. Expression and pharmacological characterization of the human mu-opioid receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEBS Lett 394:268-72.

Toda N, Tago K, Marumoto S, Takami K, Ori M, Yamada N, Koyama K, Naruto S, Abe K, Yamazaki R, Hara T, Aoyagi A, Abe Y, Kaneko T, Kogen H. 2003. A conformational restriction approach to the development of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease. Bioorg Med Chem 11:4389-415.

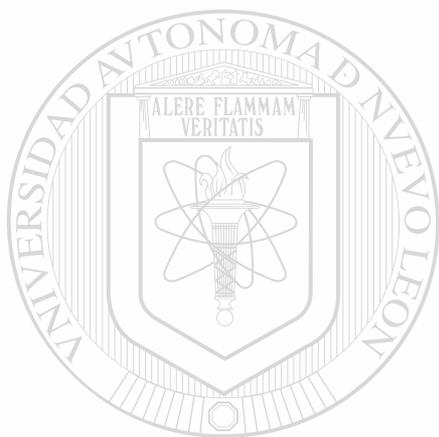
Unwin N. 1995. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. Nature 373:37-43.

Unwin N. 1996. Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits. J Mol Biol 257:586-96.

Wahl P, Ragsdale D, Schousboe A, Miledi R. 1993. Expression of neurotransmitter receptors by messenger RNAs from neurons developing in vitro: A *Xenopus* oocyte expression study. J. Neurochem 60: 57-65.

Watling K.J. 1998. The RBI Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction. RBI. Third Edition.

- Weiss HM, Grisshammer R. 2002. Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in *Escherichia coli*. Eur J Biochem 269:82-92.
- Weiss HM, Haase W, Michel H, Rellander H. 1995. Expression of functional mouse 5-HT5A serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. FEBS Lett 377:451-6.
- Weiss HM, Haase W, Michel H, Rellander H. 1998. Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT5A 5-hydroxytryptamine receptor and the human beta2-adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biochem J 330:1137-47.
- Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. 1992. Effects of steroids on gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by poly(A)+ RNA from mammalian brain and retina. Mol Pharmacol 41:89-103.
- Woodward RM, Polenzani L y Miledi R. 1993. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive ( $\rho$ -like)  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of  $\gamma$ -aminobutyric acid A and  $\gamma$ -aminobutyric acid B receptors agonists and antagonists. Mol Pharmacol 34:605-625.
- Xue H, Chu R, Hang J, Lee P, Zheng H. 1998. Fragment of GABA(A) receptor containing key ligand-binding residues overexpressed in *Escherichia coli*. Protein Sci 7:216-9.
- Yellen G, Migeon JC. 1990. Expression of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor subunits in yeast is enhanced by use of yeast signal sequences. Gene 86:145-52.



## **APÉNDICE**

Artículo generado de la tesis

# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# Functional expression in frog oocytes of human $\rho 1$ receptors produced in *Saccharomyces cerevisiae*

Alejandro Martínez-Martínez<sup>1\*</sup>, Jorge Mauricio Reyes-Rulz<sup>2</sup>, Ataúlfo Martínez-Torres<sup>2\*</sup>, and Ricardo Miledi<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, Department of Neurobiology and Behavior, University of California, McLaugh Hall 1115, Irvine, CA 92697-4550; and <sup>2</sup>Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, AP 1-1141, México

Contributed by Ricardo Miledi, November 14, 2003

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was engineered to express the  $\rho 1$  subunit of the human  $\gamma$ -aminobutyric acid  $\rho 1$  (GABA $\rho 1$ ) receptor. RNA that was isolated from several transformed yeast strains produced fully functional GABA receptors in *Xenopus* oocytes. The GABA currents elicited in the oocytes were fast, nondesensitizing chloride currents; and the order of agonist potency was GABA >  $\beta$ -alanine > glycine. Moreover, the receptors were resistant to bicuculline, strongly antagonized by (1,2,5,6 tetrahydropyridine-4-yl)methylphosphinic acid, and modulated by zinc and lanthanum. Thus, the GABA receptors expressed by the yeast mRNA retained all of the principal characteristics of receptors expressed by cDNA or native retina mRNAs. Western blot assays showed immunoreactivity in yeast plasma membrane preparations, and a  $\rho 1$ -GFP fusion gene showed mostly intracellular distribution with a faint fluorescence toward the plasma membrane. *In situ* immunodetection of  $\rho 1$  in yeast demonstrated that some receptors reach the plasma membrane. Furthermore, microtransplantation of yeast plasma membranes to frog oocytes resulted in the incorporation of a small number of functional yeast  $\rho 1$  receptors into the oocyte plasma membrane. These results show that yeast may be useful to produce complete functional ionotropic receptors suitable for structural analysis.

GABA $\rho$  | recombinant expression | yeast

Fast neuronal inhibition in vertebrates is mediated mainly through  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-activated chloride receptor channels, which are genetically related to the nicotinic acetylcholine (nAChR), glycine, and serotonin 3 receptors. Most of the structural knowledge on ionotropic neurotransmitter receptors is based on data obtained from the *Torpedo* electric organ nAChR (1), and more recently from crystals of the soluble acetylcholine-binding protein (AChBP) (2). Thus, it is mainly by analogy to the nAChRs that the stoichiometry of ionotropic GABA receptors is assumed to be pentameric. Some electron microscope images of native GABA $\rho$  receptors suggested a pentameric array with a central pore (3). However, efforts to obtain more detailed structural information of ionotropic GABA receptors have been greatly hampered by the present inability to overproduce, and crystallize, fully functional membrane proteins.

GABA $\rho$  receptors are expressed most abundantly in the retina and are formed by the homomeric assembly of a single class of subunit (the  $\rho$  subunits). To date, three cDNAs have been cloned ( $\rho 1$ – $\rho 3$ ) with at least two splicing variants (4–6). Whether homomeric assembly of GABA $\rho$  receptors occurs *in vivo* is still not clear. Nevertheless, when expressed in heterologous systems, such as frog oocytes or mammalian cells in culture, each of the  $\rho$  subunits produces receptors that gate low-desensitizing, bicuculline-resistant chloride currents that have properties similar to those of GABA $\rho$  receptors from the vertebrate retina or of receptors expressed in frog oocytes by retina poly(A)<sup>+</sup> RNA (7, 8).

Although a great deal of functional and pharmacological information exists on ionotropic GABA receptors, there is still

a big gap concerning their structure. In view of the relative simplicity of GABA $\rho$  receptors, we have taken the first steps toward producing the human  $\rho 1$  subunit in a recombinant system, aiming at expressing enough protein suitable for structural analysis. We opted for the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, because this is a simple eukaryote, easy to manipulate, and relatively inexpensive to grow, thus offering an attractive road toward the production of large amounts of recombinant receptor proteins.

To determine whether the yeast recombinant RNAs and proteins retain the properties of the original retina receptor we injected either the mRNA or plasma membranes from  $\rho 1$ -transformed yeast into frog oocytes, followed by electrophysiological recordings of the receptors "expressed" in the oocyte's plasma membrane.

## Materials and Methods

**Plasmid Manipulations.** Expression plasmids for the production of  $\rho 1$  or a fusion  $\rho 1$ -GFP were based on the plasmid pYEX-BX (Clontech), which carries the Cu<sup>++</sup> inducible transcriptional promoter of the *S. cerevisiae* metallothionein gene driving the expression of the gene of interest. The  $\rho 1$ -GFP construct is known to produce fully functional GABA receptors when expressed in frog oocytes (9), thus offering the possibility of following up the expression of the chimeric receptor by simple fluorescence microscopy analysis.

$\rho 1$  was shuttled as a *Bam*HI–*Xho*I fragment into the *Bam*HI–*Sal*I sites of pYEX-BX, yielding the plasmid pYEX $\rho 1$ . A three-way ligation was used to assemble the plasmid pYEX $\rho 1$ -GFP. pYEX-BX was cut with *Bam*HI and *Sal*I and ligated to a *Bam*HI–*Hind*III fragment carrying part of the 5' end of  $\rho 1$  and a *Hind*III–*Xho*I fragment carrying the 3' end of  $\rho 1$  fused to GFP. For  $\rho 1$  cRNA synthesis we used the plasmid pAV111 linearized with *Sal*I as template, and *in vitro* transcription was done as described (10).

**Transformation and Induction of Expression in *S. cerevisiae*.** *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) was transformed with pYEX-BX, pYEX $\rho 1$ , or pYEX $\rho 1$ -GFP by the CaCl<sub>2</sub> protocol (11), and, after selection, a single colony was used to isolate the plasmids for yeast transformation. *S. cerevisiae* (DY150 MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *leu 2-3*, *112*, *trp1-1*, *ade2-1*, *his3-11 can1-100* from Clontech) was transformed with 10  $\mu$ g of plasmid by using the LiCl<sub>2</sub> method (PT3081-1 from Clontech). Transformed cells were plated on yeast nitrogen base (YNB) uracil-deficient selective agar. A second selection consisted in propagating colonies in YNB uracil-, leucine-, adenine-, tryptophan-, and histidine-deficient plates. Positively selected colonies were grown in liquid

Abbreviations: GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; RPA, ribonuclease protection assay; TPMPA, (1,2,3,6 tetrahydropyridine-4-yl)methylphosphinic acid.

\*Present address: Laboratorio V205, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, AP 1595-D, México.

To whom correspondence should be addressed. E-mail: rmiledi@uci.edu.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

YNB-GM (growth media). After 18 h,  $\text{CuSO}_4$  was added to 0.5 mM. One hour after induction, cells were harvested by centrifugation at  $700 \times g$  for 5 min, washed three times with cold PBS, and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until used.

The strain TD4 (MATA, *his4-519, ura3-52, leu2-2, leu2-112, trp1-1, gal-2, can1 [cir+]*) has been reported to express nAChRs (12). Therefore, we also used this strain to see whether the yield of functional  $\rho 1$  receptors could be increased. TD4 was transformed and selected as described above for DY150, grown in yeast extract/peptone/dextrose broth supplemented with 1.0 mM  $\text{CuSO}_4$ . Cells were harvested by centrifugation, frozen immediately in liquid nitrogen, and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until used.

**RNA Extraction, Plasma Membrane Preparation, and Oocyte Expression.** RNAs were extracted from nontransformed yeast or yeast expressing  $\rho 1$  or the  $\rho 1$ -GFP fusion receptor. RNA was isolated from 48 h-induced yeast and was done basically as described (13). Poly(A)<sup>+</sup> RNA was isolated by oligo(dT) affinity chromatography, and 50–100 ng of poly(A)<sup>+</sup> were injected into *Xenopus* oocytes in a volume of 56 nl. As control for GABA<sub>C</sub> receptor expression we also injected oocytes with *in vitro* synthesized  $\rho 1$  cRNA (50 ng in 50 nl). Voltage-clamp recordings were performed (14) at  $-60$  mV for RNA injected oocytes and at  $-80$  mV for oocytes injected with yeast membranes, which were selected by using a sucrose gradient as described (15). Membranes were suspended at a protein concentration of 2 mg/ml. Fifty nanoliters of plasma membranes from  $\rho 1$  or  $\rho 1$ -GFP-transformed yeast were injected per oocyte, and currents were recorded from 1 h to several days after injection.

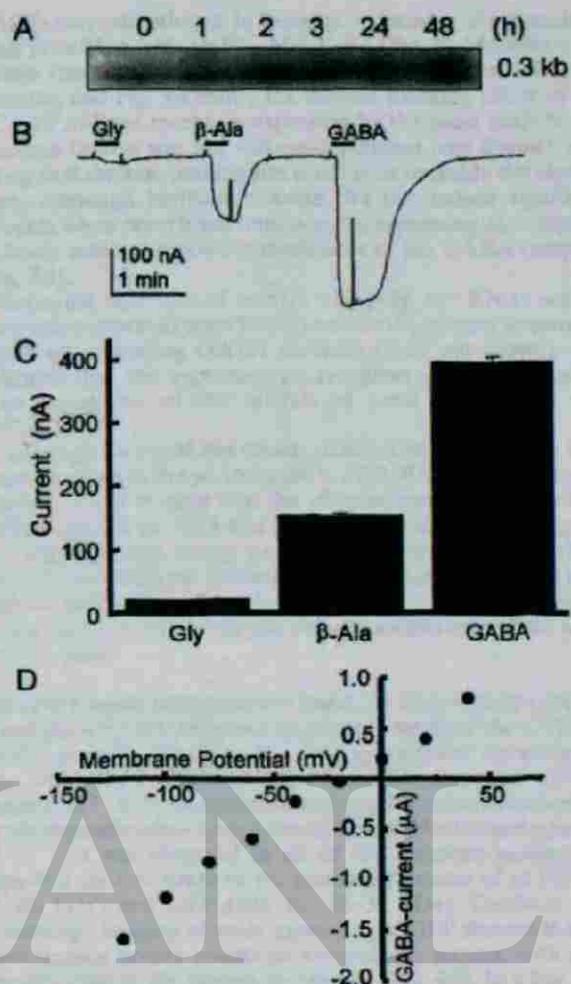
**RNA Assays.** Ribonuclease protection assays (RPAs) were performed to determine the level of expression of  $\rho 1$  mRNA in transformed yeast at different stages of induction. RNA was extracted, as described above, from yeast 0, 1, 2, and 3 h and 1–2 days after induction. The  $\rho 1$  probe was prepared by using the plasmid pAV111 as template (10). After *Pst*I restriction, the 3' overhangs were blunt-ended. An antisense RNA probe of the 3' noncoding sequence was generated with the T3 RNA polymerase (Fisher), yielding a probe of 398 bases. The radiolabeled probe was prepared by using 50  $\mu\text{Ci}$  (1 Ci = 37 GBq) of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (Amersham Biosciences). RPA was performed with the RPA III kit (Ambion, Austin, TX) by using 15  $\mu\text{g}$  of total RNA and  $7 \times 10^5$  cpm of probe per sample. Controls using yeast total RNA were set: one was digested with RNase, whereas the other was not digested to assess the integrity of the probe and to detect any RNase contamination during the procedure.

**Western Blots, Immunodetection, and Confocal Microscopy.** Immunoblots of extracted yeast membranes were performed by using either a rabbit antiserum against a synthetic 15-mer peptide of the N terminus of  $\rho 1$  (HEMSKKGRPQRORRE) made on request (Sigma-Genosys) at 1:250 or a rabbit serum anti-GFP (BioReagents) 1:2,000. In both cases, the second antibody was a goat IgG against rabbit IgG (Sigma) coupled to alkaline phosphatase 1:100,000.

Living yeast cells were processed for confocal microscopy as described (16). For cells expressing  $\rho 1$ -GFP, a double filter unit was used, exciting at 580 nm. Immunofluorescence labeling with Texas red was done on nonpermeabilized yeast by using a 1:100 dilution of the rabbit anti  $\rho 1$  and goat anti-rabbit IgG-Texas red (Molecular Probes).

## Results

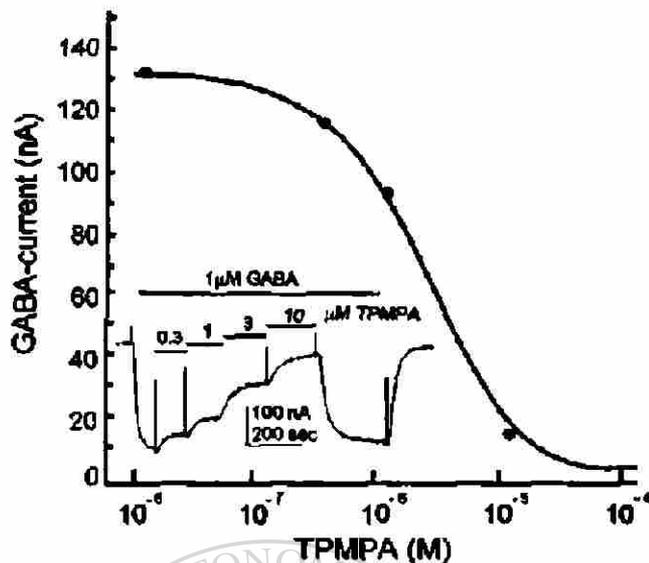
**RNA from  $\rho 1$ -Transformed Yeast Produces Functional GABA Receptors in Frog Oocytes.** After repeated trials, using several conditions for expression of  $\rho 1$  (temperature shifts from 25 to 30°C;  $\text{CuSO}_4$  concentration 0.01–1.0 mM), the yeast did not produce large amounts of the receptor, as judged by SDS/PAGE (data not



**Fig. 1.** Coding potential of mRNA isolated from yeast expressing  $\rho 1$ . (A) RPA of the 3' UTR of poly(A)<sup>+</sup>  $\rho 1$ -mRNA. A faint protected band is observed even before induction (0) and is expressed increasingly after induction (1–48 h). (B) Currents generated by glycine,  $\beta$ -Alanine, and GABA (all 1 mM) in a representative oocyte injected with RNA isolated from  $\rho 1$ -expressing yeast (holding potential  $-60$  mV). (C) Amplitude of the currents elicited by GABA,  $\beta$ -alanine, and glycine (1 mM,  $n = 10$ ) in oocytes from one frog. The percent ratio for  $\beta$ -alanine/GABA and glycine/GABA was 39% and 4%, respectively. (D) GABA current-voltage relation in an oocyte injected with mRNA from  $\rho 1$ -transformed yeast.

shown). To investigate whether the low level of expression was due to problems in either transcription or translation, we decided to determine whether the  $\rho 1$  mRNA was correctly expressed in the yeast. To monitor yeast transcription of  $\rho 1$  mRNA after  $\text{Cu}^{++}$  induction we used RPAs. After induction, we detected increasing levels of the  $\rho 1$  transcript, although some hybridization was detected even before  $\text{Cu}^{++}$  was added (Fig. 1A). This spurious expression is attested by low levels of fluorescence in noninduced  $\rho 1$ -GFP-transformed yeast (see below). The probe was annealed to the noncoding 3' end of  $\rho 1$ , which secured that the transcript was properly extended up to the transcriptional stop signal. The functional properties of the receptors encoded by the transformed yeast mRNA were determined by using frog oocytes as an expression system.

For example, when exposed to GABA (1 mM), oocytes injected with poly(A)<sup>+</sup> RNA isolated from  $\rho 1$ -transformed yeast or with *in vitro* transcribed  $\rho 1$  cRNA generated currents of  $400 \pm$



**Fig. 2.** TPMPA blocks GABA currents in oocytes expressing yeast poly(A)<sup>+</sup> mRNA. Increasing concentrations of TPMPA (0.3–10 μM) were added in the presence of GABA (1 μM), as indicated in inset from an oocyte injected with mRNA from ρ1-expressing yeast. The TPMPA IC<sub>50</sub> was 3.2 μM.

50 and 2,000 ± 100 nA (each eight oocytes), respectively. In both cases, GABA elicited nondesensitizing inward currents. Because the amino acids glycine and β-alanine are agonists of ρ1 receptors (17), it was of interest to determine whether they exert a similar action on receptors encoded by the yeast mRNA. Glycine and β-alanine also elicited currents in oocytes injected with mRNA isolated from ρ1-transformed yeast (Fig. 1B). Mean amplitudes of the currents generated by GABA, β-alanine, or glycine (all 1 mM) in oocytes injected with yeast poly(A)<sup>+</sup> RNA are illustrated in Fig. 1C. The agonist potencies were similar to those previously described for cloned ρ1 receptors, i.e., GABA (100%) > β-alanine (39%) > glycine (4%) (cf. 17).

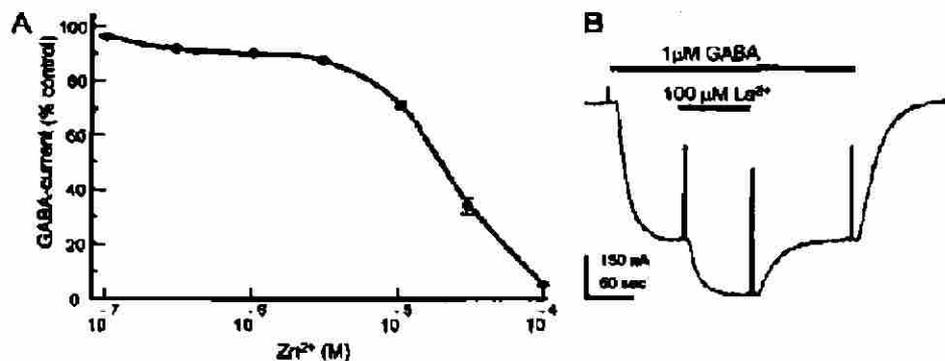
To identify the ion permeating through the receptor channel, the current reversal potential was determined while activating the receptors with GABA. The voltage–current relation indicates a nonrectifying channel with a reversal potential around –20 mV (Fig. 1D), as expected for chloride ions in *Xenopus* oocytes using Ringer as external solution (18). The GABA<sub>A</sub>-specific antagonist 1,2,5,6 tetrahydropyridine-4-yl)methylphosphinic acid (TPMPA) (19) potently, and reversibly, reduced the

GABA currents elicited in oocytes expressing the translated yeast ρ1 mRNA with an IC<sub>50</sub> of 3.2 μM (Fig. 2). Moreover, it is known that zinc<sup>2+</sup> and lanthanum<sup>3+</sup> modulate the human ρ1 receptor, and Fig. 3A shows the current blocking effect of zinc (IC<sub>50</sub> 28 μM) on receptors expressed by the yeast mRNA. The blockage by zinc was not voltage-dependent (not shown), indicating that the zinc-binding site is not near or inside the channel pore. Although lanthanum alone did not induce significant currents when superfused onto oocytes expressing ρ1 receptors, it clearly acted as a positive modulator of the GABA receptors (Fig. 3B).

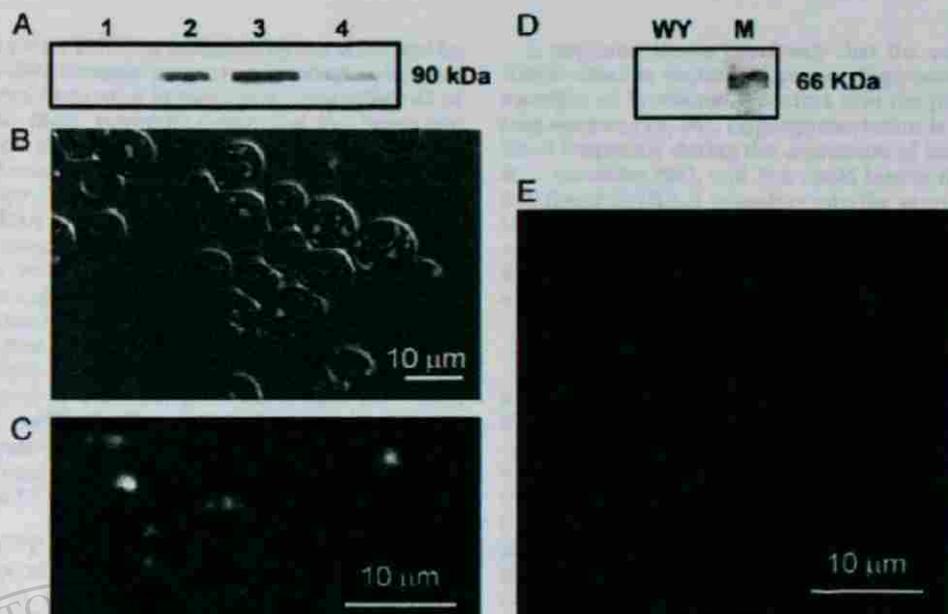
Repeated injections of oocytes with poly(A)<sup>+</sup> RNAs isolated from untransformed yeast failed to make the oocytes acquire the ability of generating GABA currents (data not shown). This indicates that the expressed ρ1 receptors derived exclusively from translation of the mRNA of yeast transformed with pYEXρ1.

Although we could not clearly detect a distinct protein band corresponding to the ρ1 receptor in SDS/PAGE of whole yeast extracts, it was evident that the ρ1 gene was successfully transcribed because ρ1 RNA was effectively produced. This suggests that a limiting step during, or after, translation of the ρ1 mRNA might be affecting the synthesis of the receptor in yeast. Therefore, we used other approaches to determine whether functional receptors were present in the plasma membrane of the transformed yeast.

**The ρ1-GFP Fusion Is Translated in Yeast.** To determine the cellular distribution of the receptors expressed, we used the pYEXρ1-GFP construct to study *in vivo* the expression of the receptors. Fig. 4A shows a Western blot of ρ1-GFP, using an antibody against GFP. Yeast subcellular compartments were fractionated by ultracentrifugation (see Materials and Methods), and a protein of 90 kDa was observed in all of the fractions analyzed, as expected for the fusion of the molecular masses of ρ1 (473 aa, 57–60 kDa) and GFP (238 aa, 28–30 kDa). Confocal laser microscopy imaging of yeast expressing ρ1GFP showed that the fluorescence occurs mainly as intracellular puncta, with some clusters close to the plasma membrane (Fig. 4B). In a few cells, a faint evenly distributed fluorescence was located near or at the plasma membrane (Fig. 4C). Oocytes injected with poly(A)<sup>+</sup> RNA isolated from these yeast induced GABA currents with properties similar to those of oocytes injected with RNA of yeast expressing wtρ1, i.e., currents that were nondesensitizing, bicuculline-resistant, and strongly antagonized by TPMPA (Fig. 5). A faint green fluorescence was also detected in transformed but noninduced cultures. Because no fluorescence was detected in nontransformed yeast, or in those expressing ρ1, this indicates that the *CUP1* promoter is not tightly regulated or that the



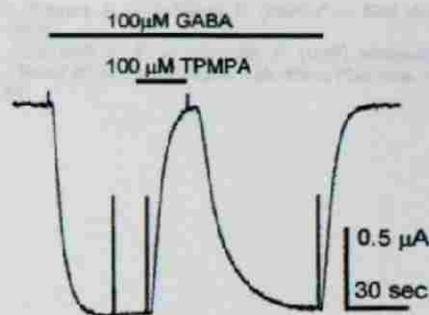
**Fig. 3.** Zinc and lanthanum modulation of ρ1 receptors. (A) Zinc dose–current response relation in oocytes injected with poly(A)<sup>+</sup> from yeast transformed with ρ1. The zinc IC<sub>50</sub> was 28 μM. (B) Sample record illustrating the GABA-current potentiation by lanthanum.



**Fig. 4.**  $\rho 1$  and  $\rho 1$ -GFP are in plasma membrane fractions. (A) Western blot using anti-GFP antibody applied to sucrose gradient fractions during purification of plasma membranes from yeast expressing  $\rho 1$ -GFP. Lane 1, crude extract; lane 2, crude membranes after differential centrifugation; lane 3, plasma membranes (43% sucrose); lane 4, flow-through (53% sucrose). Each lane was loaded with 15  $\mu$ g of protein. (B) Confocal image of living yeast expressing  $\rho 1$ -GFP superposing fluorescent and phase-contrast images. (C) Yeast from the same culture showing a faint evenly distributed fluorescence located at, or near, the plasma membrane. (D) GABA $\rho 1$  receptors detected by Western blots of whole yeast extracts (WY) and plasma membranes (M). (E) GABA $\rho 1$  receptors in the yeast plasma membrane. Nonpermeabilized yeast expressing GABA $\rho 1$  receptors were exposed to a rabbit antibody against the N-terminal of  $\rho 1$  followed by a second antibody labeled with Texas red.

presence of  $\text{Cu}^{++}$  or another metal in the growth media is constitutively activating the promoter.

**$\rho 1$  Is Sorted to the Yeast Plasma Membrane.** Some plasma membrane localization of  $\rho 1$ -GFP protein is suggested by Western blots of fractionated yeast extracts, as well as by the fluorescence of living cells. Again, Western blot assays using whole  $\rho 1$ -yeast extracts did not show an obvious immunoreaction, whereas the fraction corresponding to the plasma membrane showed an immunoreacting protein band of  $\sim 66$  kDa (Fig. 4D). Moreover, using our antibody against  $\rho 1$  and IgG-Texas red as second antibody in nonpermeabilized yeast expressing  $\rho 1$  we found that some receptors are in the plasma membrane and that they have an extracellular antigenic site that is recognized by the  $\rho 1$  antibody (Fig. 4E). Although these results suggest strongly that  $\rho 1$  receptors are reaching the yeast plasma membrane, they do not demonstrate that the receptors are functional.



**Fig. 5.** TPMPA block of GABA $\rho 1$ -GFP receptors expressed in an oocyte by transformed yeast mRNA. The holding potential was  $-60$  mV.

To determine whether the  $\rho 1$  receptors in the yeast membrane are functional, we injected oocytes with plasma membranes isolated from  $\rho 1$ -expressing yeast, expecting to "transplant" to the oocyte plasma membrane the receptors already anchored in the yeast plasma membrane. This approach has been used successfully to microtransplant receptors from the electric organ of *Torpedo* and from the human brain (20, 21) to the oocyte plasma membrane. Membranes isolated from  $\rho 1$ -expressing yeast induced the oocytes to acquire the ability to generate nondesensitizing bicuculline-resistant GABA currents. However, the amplitude of these currents was only 5–7 nA (GABA 1 mM), suggesting that the  $\rho 1$  receptors are not very abundant in the yeast plasma membrane, that they are not properly assembled, or that the oocyte plasma membrane cannot incorporate the yeast membranes as efficiently as it does other eukaryotic membranes.

#### Discussion

Gathering information on ionotropic receptors at the atomic level is a very difficult task because it has not been possible to crystallize the complete receptors. Therefore, as a first step toward establishing the  $\rho 1$  receptor as a model for detailed biophysical and structural studies we have expressed the  $\rho 1$  receptor in yeast. We have focused on  $\rho 1$ , because this is a comparatively simple homo-oligomeric receptor that desensitizes very little and may thus help in obtaining more detailed structural/functional information. So far, *S. cerevisiae* has not efficiently overproduced functional  $\rho 1$  receptors. The results suggest that the expression problems may involve steps downstream, or during, translation of the  $\rho 1$  mRNA. It has been argued that high concentrations of a cDNA or mRNA poorly predict the abundance of their encoded protein in yeast (22–24). However, we found abundant expression of both  $\rho 1$  and  $\rho 1$ -GFP mRNAs, indicating an efficient transcription. Furthermore, the

mRNA carries the entire ORF, as indicated by the RPA and by the substantial GABA currents generated by oocytes injected with mRNAs isolated from yeast induced to express either  $\rho 1$  or  $\rho 1$ -GFP. Moreover, those receptors conserved the functional and pharmacological characteristics of typical GABA $\rho 1$  receptors, i.e., slow desensitization, insensitivity to bicuculline, TPMFA antagonism, and zinc and lanthanum modulation. Although the  $\rho 1$  RNA is abundant and translated by the yeast, the low yields of receptors indicates translational or posttranslational problems, such as protein truncation, read-through products, inclusion-aggregation, or hyperglycosylation.

The *CUP1* promoter in pYEX-BX is putatively tightly regulated and independent of culture conditions (24). However, we observed a clear fluorescence (for  $\rho 1$ -GFP) and spurious transcription (as detected by RPA for  $\rho 1$ ) even before  $\text{Cu}^{++}$  was added to the media, indicating that there is some transcriptional leakage. An explanation for this basal expression of RNAs could be the presence of traces of  $\text{Cu}^{++}$  or other inducing metals in the yeast nitrogen base (YNB) and yeast extract/peptone/dextrose broths.

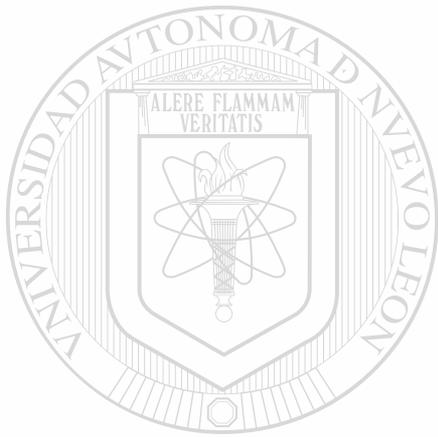
The  $\rho 1$  and  $\rho 1$ -GFP receptors expressed in yeast carry their own native-signal peptide and several lines of evidence indicate that the receptor is reaching the plasma membrane, most probably directed by this signal. Firstly, immunostaining of  $\rho 1$  in nonpermeabilized yeast locates the receptors at the plasma membrane. Second, Western blot analysis of cell fractions, selected by sucrose gradient and ultracentrifugation, disclosed  $\rho 1$  and GFP immunoreactive bands in the plasma membrane fraction. Finally, because noninjected oocytes, and oocytes injected with membranes from nontransformed yeast, did not respond to GABA, the GABA currents elicited in the oocytes injected with plasma membranes from transformed yeast are definitive proof that some GABA receptors are incorporated in the yeast plasma membrane and that these receptors are functional.

It has been shown previously that the assembly of nicotinic AChR subunits requires a proper N-glycosylation for efficient insertion of functional receptors into the plasma membrane of frog oocytes (25, 26). Hyperglycosylation is a problem encountered frequently during the expression of heterologous proteins in *S. cerevisiae* (24), and this could hinder the incorporation of functional GABA $\rho 1$  receptors into the yeast plasma membrane. On the other hand, Western blot assays of  $\rho 1$ -expressing yeast occasionally showed anti- $\rho 1$  immunoreactive bands of molecular weights higher than the one predicted by the receptor's primary sequence. Whether this discrepancy is due to differential glycosylation, clustering, or other modifications still remains to be elucidated.

In conclusion, our results demonstrate that the plasma membrane of  $\rho 1$ -expressing yeast contains some GABA $\rho 1$  receptors that are functional when "microtransplanted" to *Xenopus* oocytes. Although the number of transplanted receptors is still rather small, these experiments point the way toward designing strategies aimed at increasing the number of fully functional neurotransmitter receptors in yeast. In addition, transfer of yeast plasma membranes or poly(A)<sup>+</sup> RNA into frog oocytes, combined with electrophysiological techniques, provides a powerful method for studying the properties of yeast native ion channels and receptors as well as of heterologously expressed proteins.

We thank the University of California, Irvine, Imaging Facility for use of the confocal microscope and H. Nguyen and L. V. Mendez for technical assistance. A.M.-M. thanks the FEW Charitable Trusts for a Latin American Fellowship, and I.M.R.-R. thanks the Universidad Autónoma de Nuevo León and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) (CONACYT) for support. This work was supported by the National Science Foundation (Neural and Glial Mechanisms) and a University of California-Mexico grant to R.M. and A.M.-T. The cost of publication was partially defrayed by Universidad Nacional Autónoma de México (212702) and CONACYT (41309Q).

- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., & Unwin, N. (1999) *J. Mol. Biol.* **288**, 765-786.
- Cromer, B. A., Morton, C. J., & Parker, M. W. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**, 280-27287.
- Nayeen, N., Green, T. P., Mardia, L. L., & Barnard, E. A. (1994) *J. Neurochem.* **62**, 815-818.
- Martínez-Torres, A., Vázquez, A. E., Panicker, M. M., & Miledi, R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4019-4022.
- Denturo, A., Martínez-Torres, A., & Miledi, R. (2000) *Neurosci. Res.* **36**, 141-146.
- Enz, R. (2001) *Biol. Chem.* **382**, 1111-1122.
- Curtin, G. R., Lu, L., O'Hara, B. F., Kresch, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Cuggino, W. B., Uhl, G. R., et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2673-2677.
- Polenzani, L., Woodward, K. M., & Miledi, R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4318-4322.
- Martínez-Torres, A., & Miledi, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1947-1951.
- Calvo, D. J., Vázquez, A. E., & Miledi, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12725-12729.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 2nd Ed., pp. 1.82-1.84.
- Jansen, K. U., Conroy, W. G., Claudio, T., Fox, T. D., Fujita, N., Hamill, O., Lindstrom, J. M., Luther, M., Nelson, N., Ryan, K. A., et al. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15022-15027.
- Sherman, F. (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 3-21.
- Miledi, R. (1982) *Proc. R. Soc. London* **215**, 491-497.
- Serrano, R. (1988) *Methods Enzymol.* **157**, 533-544.
- Pringle, J. R., Adams, A. E. M., Drubin, D. G., & Haxner, B. K. (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 567-608.
- Calvo, D. J., & Miledi, R. (1995) *NeuroReport* **6**, 1118-1120.
- Kasano, K., Miledi, R., & Stianakre, J. (1982) *J. Physiol.* **328**, 143-170.
- Ragozzino, D., Woodward, R. M., Murata, Y., Eusebi, F., Overman, L. E., & Miledi, R. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 1024-1030.
- Marsal, J., Tigyi, G., & Miledi, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5224-5228.
- Miledi, R., Eusebi, F., Martínez-Torres, A., Palma, E., & Trénel, F. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13238-13242.
- Blackstock, W. P., & Weir, W. P. (1999) *Trends Biotechnol.* **17**, 121-127.
- Rudd, K. E., Humphrey-Smith, I., Wasinger, V. C., & Bairoch, A. (1998) *Electrophoresis* **19**, 536-544.
- Wasinger, V. C., & Humphrey-Smith, I. (1998) *FEBS Microbiol. Lett.* **169**, 375-382.
- Sunukawa, K., Parker, I., & Miledi, R. (1988) *Brain Res.* **444**, 191-199.
- Sunukawa, K., & Miledi, R. (1989) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **5**, 183-192.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



