

EXPRESIÓN DEL DOMINIO AMINO TERMINAL DEL RECEPTOR HUMANO

GABA_c RHO1 EN *E.coli*

Mora Juárez, A.; López Salas, E.; Martínez Torres, A., Miledi, R.

/ Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla

RESÚMEN

Uno de los aspectos fundamentales en el estudio de las neurociencias es el dedicado a la neurotransmisión, mecanismo que permite que las células neurales se comuniquen entre sí. Se han descrito diversos tipos de neurotransmisores, inhibidores y excitadores, los neuroreceptores de GABA o ácido γ -aminobutírico se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y son muy importantes en la inhibición en la transmisión sináptica en los humanos, esta función inhibitoria esta mediada por los receptores presentes en la membrana celular y resulta en una reducción de la excitación neuronal. Los últimos miembros de la familia de receptores GABA identificados son los receptores GABA_c, que son canales iónicos selectivos a cloro; su alta expresión en la retina de los vertebrados sugiere un papel muy importante en los procesos de señalización de ésta.

El presente trabajo pretende la expresión del dominio amino terminal de la subunidad rho1 de GABA_c en *E.coli*. Se usará PCR para la amplificación de la región que codifica este dominio, técnicas de clonación para construcción del plásmido recombinante, expresión de éste en *E.coli*. Obteniendo resultados favorables que demuestran expresión positiva en la cepa ER2566.

INTRODUCCION

El ácido γ -aminobutírico (GABA) fue descubierto por Roberts y Frankel en 1950. GABA es un amino ácido no proteico encontrado en organismos procariotes y eucariotes (Helle y col., 1999) y el neurotransmisor inhibitorio más importante del cerebro. La función principal de GABA es la inhibición en el potencial sináptico (Nicholls y col., 1993) y su modulación es fundamental en el tratamiento clínico de desordenes neuronales, como lo son algunos estados ansiolíticos y epilépticos (Enna y Bowery, 1997).

EXPERIMENTAL

1. Transformación bacteriana a partir del plásmido pCDNA_{3,1}-Rho1

Se transformaron 50 μ L de bacterias *E. coli* XL 1Blue en estado competente, con 1 μ L del plásmido pCDNA_{3,1}-Rho1 (100ng/ml). Esta transformación fue sembrada en una placa de agar LB con ampicilina [100 μ g/mL]. Las placas se incubaron durante 15 horas a 37°C.

2. Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina

Se seleccionaron de las placas de cultivo aquellas colonias de bacterias que crecieron después de ser transformadas. Se propagaron en 4mL de medio LB con ampicilina [100 μ g/mL], incubándolas durante 17 horas a 37°C y 180 rpm. Concluido el tiempo de incubación, se recolectaron las bacterias por centrifugación a 7000 rpm durante 3 min. a 4°C. Posteriormente, se suspendieron en 200 μ L de la solución I (Tris Cl 25 mM, EDTA 10 mM), se adicionaron 200 μ L de la solución II de lisis alcalina (NaOH 0.2 N, SDS 1%). La mezcla se neutralizó adicionando 300 μ L de la solución III (acetato de potasio 5M al 60%, ácido Acético glacial 11.5%). Los restos celulares de la reacción de lisis se precipitaron a 10,000 rpm durante 5 min. a 4°C, y el sobrenadante se colocó en un tubo Ependorff nuevo al que se le agregó un volumen igual de fenol saturado. Se homogenizó la mezcla y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. a 4°C; la fase acuosa se separó en un tubo nuevo y se añadieron 2.5 volúmenes de etanol frío al 100%, se

incubó en hielo para favorecer la precipitación del DNA plasmídico y después se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. a 4°C. El DNA se lavó con etanol al 70% centrifugando a 13,000 rpm durante 10 min. a 4°C. Se desechó el etanol y se dejó secar, después se suspendió en 20 µL de H₂O MQ esterilizada y se guardaron a -20°C.

3. Amplificación del fragmento NH₂ de la subunidad ρ1 del receptor a GABA_C mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a partir del plásmido pCDNA_{3.1}-Rho1 usado como molde

Se diseñaron los oligonucleótidos para generar el fragmento NH₂ del gen que codifica para subunidad ρ1 del receptor a GABA_C, sin la secuencia del péptido señal, según la secuencia publicada del gen GABA_C ρ1 (Cutting y col., 1991) y se incluyeron los sitios de restricción *Nco* I y *Xho* I en los extremos 5' y 3' respectivamente.

4. Separación y purificación de los fragmentos amplificados por PCR

El fragmento NH₂ obtenido por PCR se separó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (10mg/mL al 1%), el fragmento se cortó y se pesó. Para la purificación se utilizó el kit de extracción de DNA en gel QIAGEN, mediante el siguiente procedimiento. Se añadieron 3 volúmenes (peso del gel-volumen de solución) de la solución QG y se incubaron a 50°C hasta que se disolvió el gel, se homogenizó la mezcla y se hizo pasar por una columna de separación centrifugando a 13,000 rpm durante 1 minuto. Una vez retenido el DNA en la columna, se lavó adicionando 750µL de la solución PE centrifugando a 13,000 rpm durante 1 minuto. El DNA se eluyó en 30 µL de H₂O DEPC por centrifugación, a 13,000 rpm durante min. y se guardó a -20°C.

5. Clonación del fragmento NH₂ en el plásmido pGEM-T_(Easy).

Alícuotas de 0.5µL del plásmido pGEM-T_(Easy) guardadas a -20°C se utilizaron para cada una de las reacciones de clonación que se prepararon según se muestra en el Cuadro 4.

Una vez preparada la mezcla de reactivos, se incubó la reacción a temperatura ambiente durante toda la noche, después se tomó una alícuota para hacer una transformación en bacterias *E. coli* XL 1blue, el resto se guardó a -20°C.

6. Transformación en bacterias *E. coli* XL 1blue y caracterización del producto de ligación

Se transformaron 50 µL de bacteria *E. coli* XL 1blue con 5 µL de la reacción de ligación del fragmento NH₂ en el plásmido pGEM-T_(Easy), diluidos en 5µL de H₂O MQ estéril. Se colocaron en hielo durante 30 minutos y se dió un choque térmico a 42°C durante 3 min. Posteriormente se pusieron en hielo durante 2 min. Después, las bacterias se colocaron en 1mL de medio LB incubándolas durante 2 horas a 37°C. Las bacterias se concentraron por centrifugación a 7000 rpm durante 1 min., y se suspendieron en 200µL del mismo medio, mismos que se colocaron en una placa de agar LB con ampicilina [100µg/mL], con 50 µL de X-gal al 2% y 20 µL de IPTG al 20%, distribuyendo homogéneamente por toda la placa. Posteriormente, las placas se incubaron durante 15 horas a 37°C y una 1 hora más a 4°C. Tiempo necesario para que aparecieran colonias azules que no tienen el plásmido recombinante. Se seleccionaron aquellas colonias blancas que probablemente llevan el plásmido recombinante, y se propagaron en 4 mL de medio LB con ampicilina 100µg/mL. Después se extrajo el DNA plasmídico por lisis alcalina siguiendo el procedimiento previamente descrito, y se caracterizó cada una de las colonias mediante digestión enzimática con *Eco*R1. Se determinó la secuencia nucleotídica de aquellas muestras de DNA plasmídico que fueron positivas al fragmento NH₂.

7. Subclonación del fragmento NH₂ en el plásmido pET 28b

Se transformaron bacterias *E. coli* XL 1blue en estado competente con el plásmido pET 28b, se propagaron las colonias y se extrajo el DNA plasmídico por lisis alcalina según los métodos previamente descritos. Después se establecieron las condiciones de reacción idóneas para hacer

una doble digestión enzimática con las enzimas de restricción *Nco* I y *Xho* I, del plásmido pGMT_{3.1} NH₂, quedando separado el fragmento NH₂ del resto del vector. Además, se realizó una doble digestión del plásmido pET 28b con las mismas enzimas de restricción, quedando el plásmido linearizado.

Las reacciones de restricción de la construcción pGMT_(Easy) NH₂ y del plásmido pET 28b se incubaron durante 1h. 30 min. a 37 °C, después se separaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio [10 mg/mL] al 1%. El fragmento NH₂ separado y el plásmido linearizado pET 28b se purificaron utilizando el kit para extracción de DNA en gel QIAGEN siguiendo el procedimiento ya descrito. Después se ligó el fragmento NH₂ en el plásmido pET 28b, usando una relación molar de 6 a 1 de la cantidad de inserto con respecto al plásmido en la mezcla de reacción que se muestra en el Cuadro 6. La reacción de clonación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche y después se guardó a -20°C.

8. Expresión en *E.coli* ER2566

En 4 tubos con 3 ml de medio LB con Kanamicina 50 µg/ml, se inoculó 1 colonia de NH₂ en el plásmido pET 28b y se incubaron toda la noche a 37 °C hasta obtener una DO₆₀₀ entre 0.4 y 0.5, se indujo la proteína de expresión a una temperatura de 30 °C con concentraciones de IPTG de 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 M

RESULTADOS

- Mediante la amplificación del fragmento amino terminal por medio de PCR se clono en el vector pGEM-Ty la construcción de un plásmido recombinante pET 28b con el fragmento NH₂ de la subunidad ρ1 del receptor a GABA_C se logro por medio de una subclonación.

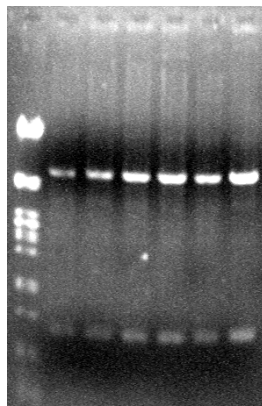


Figura I. Selección de clonas positivas tras la digestión de pET 28b con la enzima Eco R1

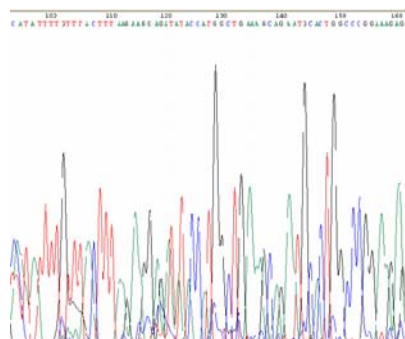


Figura III. Cromatograma de la secuenciación del DNA de la clona positiva.

- Western blot tras la inducción para la expresión del fragmento NH₂ de la subunidad ρ1 del receptor a GABA_C en *E.coli* utilizando concentraciones del inductor IPTG de 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 M .

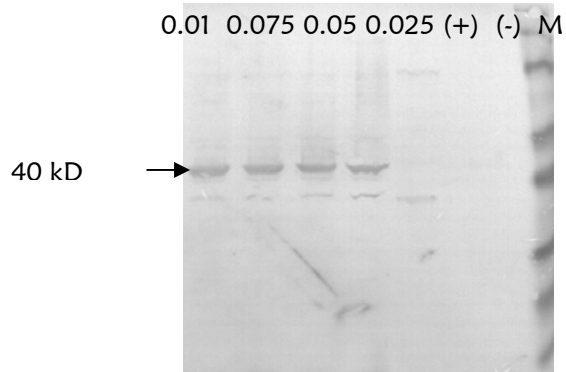


Figura III. Membrana de Western Blot con expresión positiva de la proteína deseada a diferentes concentraciones de inductor.

CONCLUSIONES

Se logró una correcta construcción de un plásmido recombinante pET 28b con el fragmento NH₂ de la subunidad ρ1 del receptor a GABA_C, esto confirmado por una electroforesis en gel de agarosa y cromatogramas.

Se encontraron las condiciones apropiadas para la expresión del fragmento amino terminal del receptor GABA_C Rho1 en *E.coli* demostrando la presencia de esta proteína en *E.coli* utilizando concentraciones del inductor IPTG de 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 M por medio de Western Blot.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Cutting**, G. R., Lu, L., O'Hara, B. F., Kash, L.M., Montrose-Rafizdeh, C., Donovan, D.M., Shimada, S., Antonarakis, S.E., Guggino, W.B., Uhi, G.R. Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) ρ 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:2673-2677. **1991**.
- Enna**, S.J., y Bowery, N.G. The GABA receptors 2a edición. The Human Press. Totowa, New Jersey, EUA 332. **1997**.
- Helle**, S., Waagpetersen, Sonnewald, U., Schousboe, A. Compartmentation of Glutamine, Glutamate, and GABA Metabolism in Neurons and Astrocytes: Functional Implications. Rev. The Neuroscientist. 9:398-403. **2003**.
- Nayeem**, N., Green, T.P., Martin, I. L., and Barnard, E. A., Quaternary Structure of the Native GABAA Receptor Determined by Electron Microscopic Image Analysis. J. Neurochem **62**,815-818. **1994**
- Nicholls**, J.G., Bruce, R.M., Wallace G.. From neuron to brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system. 3ra ed. Sunderland, Mass. Sinauer Associates. **1992**