



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Bioquímica

Profesor patrocinante Dr.
Carlos B. González
Instituto de Fisiología
Facultad de Medicina

Expresión y localización subcelular de la Isoforma V2b de receptores de Vasopresina

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al grado de *Licenciado en
Bioquímica* y al Título
profesional de *Bioquímico*

Carolina Del Carmen Anazco Oyarzún

Valdivia Chile 2002

***Dedicada a mi familia, en especial
a mis padres Miguel y Oliva
y a mis hermanos Francisco y Mirko.***

Agradecimientos

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a mi patrocinante Dr. Carlos González por su constante ayuda y sabios consejos, durante el tiempo que desarrolle éste trabajo.

También quisiera demostrar mi gratitud hacia todo el personal del Instituto de Fisiología y muy especialmente al Bioquímico señor José Sarmiento por su amistad y apoyo en mi crecimiento intelectual y como persona.

Quisiera agradecer también la ayuda brindada por el Centro de Estudios Científicos (CECS) y al laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria al permitirme el manejo de equipos para el desarrollo de ésta tesis.

A mis amigos y compañeros, especialmente a Claudio Sánchez por su comprensión y ayuda en los momentos más difíciles.

Gracias a mi familia y a Dios.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile y financiado por el proyecto Fondecyt en líneas complementarias 8980002.

INDICE DE CONTENIDOS

		Página
	ÍNDICE	i
	ÍNDICE DE FIGURAS	iii
	LISTA DE ABREVIATURAS	v
1.	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1.	MATERIALES	14
3.1.1.	Reactivos	14
3.1.2.	Equipos	16
3.2.	MÉTODOS	17
3.2.1.	Clonamiento de isoformas del receptor de vasopresina	17
3.2.1.1.	Purificación de RNA total	17
3.2.1.2.	Electroforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído	18
3.2.1.3.	Síntesis de cDNA	18
3.2.1.4.	Electroforesis en geles de agarosa	19
3.2.1.5.	Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa	20
3.2.1.6.	Purificación del DNA	20
3.2.1.7.	Ligación del fragmento codificante del receptor V2b al vector pGEM-T del DNA	21
3.2.1.8.	Transformación de células competentes	22
3.2.1.9.	Purificación del DNA plasmidial a pequeña escala	22
3.2.1.10.	Purificación del DNA plasmidial a mediana escala	23
3.2.1.11.	Cuantificación de DNA plasmidial	24
3.2.1.12.	Subclonamiento del receptor V2b de rata en el plasmidio pcDNA3	24
3.2.2.	Subclonamiento del fragmento codificante del receptor V2b de rata en el plasmidio pEGFPN1	25

3.2.2.1.	Digestión del receptor V2b de rata y del plasmidio pEGFPN1	26
3.2.2.2.	Ligación del fragmento codificante del receptor V2b al vector pEGFPN 1	26
3.2.2.3.	Análisis de restricción	27
3.2.3.	Distribución subcelular y funcionalidad de la isoforma V2b en células MDCK.	27
3.2.3.1.	Cultivos celulares	27
3.2.3.2.	Transfecciones estables	27
3.2.3.3.	Distribución subcelular de la isoforma V2b de receptores de vasopresina.	29
3.2.3.4.	Movilización de calcio	29
4.	RESULTADOS	31
4.1.	Clonamiento de isoformas de receptores V2 de vasopresina	31
4.1.1.	Gen del receptor V2 de vasopresina y diseño de partidores	31
4.1.2.	Obtención de RNA total de riñón de rata	33
4.1.3.	Amplificación del cDNA de receptores V2 de Vasopresina de rata	34
4.1.4.	Alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas	36
4.2.	Subclonamiento del fragmento codificante de receptores V2 de rata	40
4.3.	Transfecciones estables en células polarizadas MDCK y células no polarizadas CHO-K1	42
4.4.	Localización subcelular de la isoforma V2b de receptores de vasopresina	43
4.5.	Movilización de calcio	51
5.	DISCUSIÓN	58
6.	BIBLIOGRAFIA	69

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Esquema del gen del receptor V2 de vasopresina	31
Figura 2.	Diseño de partidores	32
Figura 3.	Electroforesis de RNA total de riñón de rata	33
Figura 4.	Amplificación por RT-PCR de receptores V2 de vasopresina de riñón de rata	34
Figura 5.	Alineamiento secuencia nucleotídica deducida para receptores V2 de vasopresina	37
Figura 6.	Alineamiento secuencia aminoacídica deducida para receptores V2 de vasopresina	39
Figura 7.	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del análisis de restricción de la proteína de fusión pEGFPN1/V2b	40
Figura 8.	Localización de receptores de vasopresina acoplados a GFP en células MDCK confluentes	43
Figura 9.	Localización de la proteína verde fluorescente en células CHO-K1	45
Figura 10.	Localización de la isoforma V2bGFP en células MDCK mediante microscopía confocal	46
Figura 11.	Colocalización de la isoforma V2bGFP en células MDCK mediante microscopía confocal	47
Figura 12.	Colocalización del receptor V1aGFP en células CHO-K1 mediante microscopía confocal	49
Figura 13.	Colocalización del receptor V2bGFP en células CHO-K1 mediante microscopía confocal	50
Figura 14.	Movilización de calcio en células A-10 estimuladas con AVP	52
Figura 15.	Movilización de calcio en células MDCK estimuladas con AVP	53
Figura 16.	Movilización de calcio en células MDCK estimuladas con ATP	54

Figura 17.	Movilización de calcio en células MDCK V1aGFP estimuladas con AVP	55
Figura 18.	Movilización de calcio en células MDCK V2bGFP estimuladas con AVP	56
Figura 19.	Movilización de calcio en células MDCK V2bGFP estimuladas con ATP	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ADH	Hormona antidiurética
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica de bovino
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementario
CHO-K1	Línea celular derivada de ovario de <i>hamster</i> chino
COS-7	Línea celular derivada de riñón de mono verde
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAasa	Desoxirribonucleasa H
dNTP	Dexosinucleótidos
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FcIgG	Segmento Fc de inmunoglobulina G
FSH	Hormona folículo estimulante
GFP	Proteína verde fluorescente
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GRKs	Kinasas de receptores acoplados a proteína G
HEPES	N(2 hidroxietilpiperazina-N(2 etansulfónico))
ICL ₂	Asa intracelular 2
ICL ₃	Asa intracelular 3
IP ₃	Inositol trifosfato
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LH	Hormona luteinizante
MDCK	Línea celular derivada de epitelio renal de perro
NDI	Diabetes insípida nefrogénica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína kinasa A

PKC	Proteína kinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RNAasa	Ribonucleasa
RT-PCR	Reacción de la polimerasa en cadena desde RNA total
V1a	Receptor V1a de vasopresina
V1b	Receptor V1b de vasopresina
V2b	Isoforma V2b de receptores de vasopresina
V2	Receptor V2 de vasopresina
V2L	Receptor V2 de vasopresina largo
V2s	Receptor V2 de vasopresina corto
VP	Hormona Vasopresina

1. RESUMEN

La hormona vasopresina (VP) es un nonapéptido cíclico que posee varias funciones biológicas como por ejemplo, inhibición de la diuresis, estimulación de la glicogenólisis hepática y contracción de la musculatura lisa vascular. Estos efectos son ejercidos a través de la activación de receptores que actúan acoplados a proteínas G. Tres subtipos de receptores de vasopresina han sido distinguidos sobre la base de características funcionales y farmacológicas: V1a, V1b y V2. Por experimentos de RT-PCR en riñón de rata, se detectó un producto de amplificación de aproximadamente 1100 pb. La secuenciación demostró que éste cDNA corresponde a una nueva isoforma de receptores de vasopresina a la cual denominamos V2b. Esta nueva isoforma posee una delección de 76 pb en su secuencia nucleotídica, lo que genera un cambio en el marco de lectura y un extremo carboxilo terminal completamente distinto. El objetivo de la presente tesis fue estudiar la localización subcelular de esta nueva isoforma en células epiteliales polarizadas y determinar su capacidad funcional. Para ello, el cDNA de la isoforma V2b fue subclonada en el plasmidio pEGFPN1 y posteriormente transfectada establemente en células MDCK. Estudios de microscopía confocal y el uso del marcador de membrana plasmática Di-8 ANEPPS, permitieron localizar a la proteína de fusión V2b-GFP en la membrana plasmática, encontrándose tanto en el dominio apical como basolateral. Sin embargo, la expresión pasajera del receptor V2b en células CHO mostró que esta isoforma es procesada más lentamente a la superficie celular que el receptor V1a. Estos resultados apoyan la idea que esta isoforma cumple un rol biológico importante en la fisiología tubular renal.

SUMMARY

Vasopressin hormone (VP) is a cyclic nonapeptide with plenty biological functions like, diuresis inhibition, stimulation of hepatic glycogenolysis and vascular smooth muscle contraction. These effects are exerted through the activation of vasopressin receptors coupled to G proteins. Three vasopressin receptor subtypes have been classified under the basis of their functional and pharmacological characteristic: V1a, V1b and V2. RT-PCR assays of total RNA from rat kidney samples showed an approximately 1100 bp amplification product. Sequencing of the cDNA showed that this receptor corresponds to a new vasopressin receptor isoform which we have named V2b. This new isoform bears a 76 bp deletion on its nucleotide sequence producing a reading frame shift and therefore, a totally different C-terminal tail. The aim of this work was to study the subcellular localization of this isoform in polarized epithelial cells and to determine the functional and pharmacological properties. For this purpose, cDNA V2b was subcloned on the pEGFPN1 plasmid and subsequently stably transfected in MDCK cells. Studies with confocal microscopy and the use of the plasma membrane marker Di – 8 ANEPPS, allowed us to localize the V2b-GFP fusion receptor in both apical and basolateral domains in MDCK cells. However, the transient expression of the V2b isoform showed that this receptor is processed to the surface of the cell slower than the V1a receptor isoform. These results support the idea that this isoform has an important biological role in renal tubular physiology.

2. INTRODUCCION

Vasopresina (VP) u hormona antidiurética (ADH) es un péptido cíclico compuesto por 9 residuos aminoacídicos y un puente disulfuro entre las Cys 1 y 6 (Du Vigneaud, 1954). En mamíferos es sintetizada como prohormona, junto a su neurofisisina respectiva, por neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo y es liberada a la circulación sistémica en el lóbulo neural de la hipófisis (Pickering et al., 1983). Paralelamente VP es también liberada dentro del sistema nervioso central mediante prolongaciones axonales que nacen en los núcleos hipotalámicos y que se proyectan hacia distintas regiones del cerebro. El control fisiológico de la síntesis y liberación de VP es regulada por cambios en la osmolaridad del plasma, lo cual es detectado por osmoreceptores especializados en regiones del hipotálamo anterior (Thrasher et al., 1982, Yang et al., 1994).

Esta hormona presenta variadas funciones fisiológicas, de la cual la más destacable es de tipo endocrino, participando activamente en la reabsorción de agua en el riñón. También participa en la contracción del músculo liso vascular, estimulación de la glicogenólisis hepática, agregación plaquetaria y modulación de la liberación de hormona adrenocorticotrófica desde la pituitaria. Además, de estas funciones periféricas, VP está involucrada en numerosos procesos del sistema nervioso central incluyendo funciones del tipo cognitivas tales como aprendizaje y memoria (Barberis et al., 1998).

Vasopresina actúa, a través de la unión a una familia de receptores de membrana específicos acoplados a proteínas G (GPCR). Estos presentan siete hélices o dominios transmembrana y han sido clasificados, basándose en características

farmacológicas y en los mecanismos de transducción que utilizan, como: receptor V1a de vasopresina encontrado en hígado, células de músculo liso vascular y en la mayoría de tejidos periféricos; receptor V1b de vasopresina expresado predominantemente en adenohipófisis y médula adrenal y el receptor V2 de vasopresina encontrado principalmente en riñón (Jard et al., 1998).

La unión de VP al receptor V1a y V1b activa proteína Gq produciendo la activación de fosfolipasa C, D y A₂; y por lo tanto, la producción de inositol 1,4,5 – trifosfato y diacilglicerol. IP₃, a su vez, aumenta los niveles de calcio intracelular en cambio, DAG estimula a proteína quinasa C. Por un mecanismo aún no bien estudiado estos receptores promueven la hipertrofia celular y proliferación celular (Thibonnier et al., 2000).

El receptor V2 de vasopresina es expresado predominantemente en las células principales del túbulo colector renal (Klussmann et al., 2000). Estas células tienen dos compartimientos de membrana plasmática distintos: la apical, la cual está en contacto con el líquido urinario y el basolateral, a la cual accede el ligando desde la circulación. La activación del receptor V2 en la membrana basolateral produce la estimulación de adenilato ciclasa, una enzima que se encuentra en la membrana y que se activa vía proteína Gs y por lo tanto, incrementa los niveles intracelulares AMP cíclico. A su vez, AMPc estimula a proteína quinasa A induciendo la inserción de vesículas que contienen aquaporina 2 en la membrana apical, permitiendo de esta forma la reabsorción de agua en las células principales del conducto colector renal.

Durante los últimos años se han clonado los receptores V1a de hígado de rata

(Morel et al., 1992), V1a de hígado humano (Howl et al., 1991), V1b de pituitaria humana (Sugimoto et al., 1994) y V1b de pituitaria de ratón (Ventura et al., 1999). El receptor V2 fue clonado en rata (Lolait et al., 1992), en humano (Birnbaumer et al., 1992), en ratón, cerdo y bovino (Oksche et al., 2002). Al comparar la secuencia aminoacídica de estos receptores, se observa una alta homología en las regiones de transmembrana, así como en el primero y segundo dominio extracelular, lo que sugiere que los receptores de vasopresina pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (Murasawa et al., 1995).

La secuencia nucleotídica del cDNA del receptor V1a de hígado de rata posee 1354 pb y codifica para una proteína de 394 aminoácidos con una masa molecular aparente de 44202 Da. Además, posee dos sitios putativos de N-glicosilación en la región amino terminal y numerosos sitios potenciales de fosforilación localizados en el tercer dominio intracelular y en la región carboxilo terminal, lo que sugiere que la función del receptor es regulada por proteinquinasas (Morel et al., 1992). Thibonnier y colaboradores clonaron en 1994 el cDNA del receptor V1a de hígado de humano encontrando una secuencia nucleotídica de 1472 pb que codificaba para un polipéptido de 418 aminoácidos. Esta secuencia aminoacídica era idéntica en un 72% al receptor V1a de hígado de rata.

Estudios farmacológicos y bioquímicos desarrollados en cultivos primarios de pituitaria anterior de rata han mostrado la existencia de un receptor específico de pituitaria para liberación de VP relacionado con receptores V1 (Antonni et al., 1988). Este receptor es, sin embargo, farmacológicamente distinto al receptor V1a . Es por ello que se ha denominado V1b ó V3, identificándose un cDNA de 1272 pb que

codifica para un polipéptido de 424 aminoácidos ($M_r = 46977$) con un sitio de glicosilación al extremo N-terminal (Ventura et al., 1999).

El cDNA del receptor V2 de riñón de rata, en cambio, presenta una secuencia de 1222 pb, que codifica para una proteína de 370 aminoácidos ($M_r = 40518$). Posee dos sitios putativos de N-glicosilación en el extremo amino terminal extracelular y numerosos sitios potenciales de fosforilación en la región carboxilo terminal de la proteína (Lolait et al., 1992).

El clonamiento y caracterización del gen del receptor V2 de vasopresina humano, realizado por Seibold y colaboradores en 1992, permitió determinar que está presente en el cromosoma X en la región q28–qtr. Comprende tres exones y dos intrones pequeños, el primer exón es muy corto y es prácticamente el segundo exón el que codifica para cerca del 80% del V2. Por su parte, el tercer exón codifica para el séptimo dominio de transmembrana.

Es precisamente en las regiones de transmembrana y especialmente en el segundo dominio extracelular, donde se ha determinado que existe una mayor interacción entre el receptor V2 y el ligando vasopresina. Particularmente en el residuo de Arg 202 del segundo dominio extracelular y el residuo Gly 304 en la región transmembrana siete. Los residuos aminoacídicos antes mencionados estarían involucrados en la discriminación de antagonistas, que en asociación con el residuo Lys 100 de la región transmembrana dos, serían discriminatorios para la unión a péptidos agonistas (Cotte et al., 1998).

La transducción de señales de receptores acoplados a proteínas G es caracterizada por una rápida desensibilización de tales receptores en respuesta a

prolongadas y repetidas exposiciones a agonistas (Lefkowitz, 1998). Además, en este proceso de desensibilización participa la fosforilación de dominios intracelulares del receptor a través de quinasas acoplados a receptores unidos a proteínas G (GRKs) y quinasas reguladas por segundos mensajeros como por ejemplo del tipo proteína quinasa C (Innamorati et al., 1997). Más aún, se ha encontrado que el patrón de interacción con GRKs y PKC es único para cada isoforma de receptores de vasopresina/oxitocina por medio de motivos específicos presentes en la región carboxilo terminal de estos receptores (Berrada et al., 2000).

Se sabe que el receptor V2 posee una desensibilización del tipo homóloga. El ligando vasopresina promueve internalización y fosforilación del receptor con un tipo de cinética distinta a la observada para el receptor V1a, sin producirse el reciclaje a la superficie celular, reteniendo al receptor en el interior de la célula (Birnbauer et al., 1992).

Se han obtenido evidencias que en el caso del receptor V2, el ligando induce rompimiento proteolítico del receptor por una metaloproteasa de membrana plasmática sensible a iones zinc (Kojro y Fahrenholz, 1995). El sitio de corte estaría ubicado en la transición entre el segundo dominio transmembrana y el primer dominio extracelular (Gln 92 y Val 93), estos sitios estarían implicados en la unión al ligando. Se ha visto, además, que el corte proteolítico del receptor V2 requiere una conformación definida, especialmente de los dos primeros dominios extracelulares que son inducidos por la unión al ligando. Más aún, estos estudios darían cuenta de un mecanismo especialmente único de terminación de la señal y desensibilización del receptor (Kojro et al., 1999).

El dominio carboxilo terminal intracelular del receptor V2 contiene dos residuos adyacentes de cisteínas (Cys-341 y Cys-342) que serían sitios de palmitoilación implicados en la estabilidad de la proteína sobre la superficie celular (Sadeghi et al., 1997). Mutagénesis sitio dirigida de estos residuos se utilizó para estudiar el significado funcional de la palmitoilación sobre el receptor V2, encontrándose que no eran alteradas ni las propiedades de unión al ligando ni la activación de adenilato ciclasa (AC), pero si el número de sitios de unión sobre la superficie celular, los cuales eran reducidos en un 30 %, sugiriendo un transporte defectuoso del receptor mutado a la superficie celular. Estos resultados indican que la palmitoilación del receptor V2 es importante para el tráfico intracelular y/o secuestación-internalización pero no para la unión al ligando ni activación de proteína Gs/AC (Schülein et al., 1996).

Receptores quiméricos conteniendo los segmentos intracelulares del V2 en el V1a y construcciones recíprocas, identificaron al segundo dominio intracelular de V1a como el responsable del acoplamiento a proteína $G_{q/11}$ y al tercer dominio intracelular del V2 como el sitio de acoplamiento a Gs (Liu and Wess, 1996). Experimentos adicionales de una larga lista de mutantes de receptores V2 en células COS-7 mostró que residuos polares de este Gln 225 y Glu 231, cumplirían un rol importante en el reconocimiento de proteína Gs. Mas aún, el segmento amino terminal del cuarto dominio intracelular del V2 también contribuiría al acoplamiento a Gs (Erlenbach y Wess 1998). En 1993 Rosenthal y colaboradores observaron que el segundo dominio intracelular también participaría en la interacción con Gs, puesto que pacientes afectados con diabetes insípida nefrogénica (NDI) que poseían una

mutación en la Arg 137 del receptor, que está localizada en la interfase entre el tercer y el segundo dominio transmembrana no activaban AC, a pesar de unir correctamente vasopresina.

Recientemente, se ha obtenido bastante información acerca del tráfico y destino intracelular de receptores acoplados a proteínas G. Es así, como para el receptor V2, un rol crucial en el transporte a membrana lo desarrollaría el extremo carboxilo terminal intracelular, particularmente ciertos residuos de cisteínas palmitoilados y que al ser mutados reducen en forma significativa el tráfico del receptor (Schülein et al., 1996). Además, estudios previos sugirieron la idea, que los residuos inmediatamente precedentes a las cisteínas palmitoiladas de la región carboxilo terminal, es decir, la secuencia conservada de glutamato/dileucina (³³⁵ELRSLLCC³⁴²) sería esencial para el transporte del receptor desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi (Schülein et al., 1998), además de la correcta conformación estructural del extremo carboxilo terminal (Krause et al., 2000).

Mutaciones que reducen la expresión o acoplamiento del receptor V2 son responsables del 95% de los casos de NDI, la cual es una enfermedad caracterizada por poliuria, que finalmente trae como consecuencia una severa deshidratación llegando incluso hasta la muerte. En ausencia de una vía de señalización para VP, el riñón no puede concentrar la orina y por lo tanto, se afecta la homeostasis del agua. Se han clasificado dos tipos principales de NDI, una de las cuales está asociada a mutaciones en el gen para el receptor V2 que sería identificada como NDI ligada al cromosoma X, mientras las mutaciones del gen de aquaporina-2 produce una NDI autosómica recesiva (Oksche et al., 1996, 1998). También, existe

un tipo de diabetes insípida central que estaría asociada a mutaciones en el gen precursor de neurofisiina II-VP (Schmale et al., 1993). Se han reportado más de 150 mutaciones diferentes (la mayoría *missense* y *nonsense*) del gen del receptor V2 humano y 22 mutaciones diferentes del gen de aquaporina 2 (Mulders et al., 1998). Una fracción de las mutaciones conllevan a la producción de un receptor truncado originando la aparición de un stop codon o un cambio en la estructura postransduccional. En otras mutaciones, existen cambios en simples aminoácidos, lo cual, produce un mal plegamiento de las proteínas, reteniendo al receptor al interior de la célula, reduciendo su presencia en la superficie celular. En cambio, otras mutaciones no alteran significativamente la abundancia de las proteínas en la superficie celular, pero si reducen la afinidad al ligando o la eficiencia de acoplamiento a proteínas G (Knoers, 1994).

Estudios en células polarizadas (epiteliales y neuronas) han demostrado que los receptores acoplados a proteínas G se expresan de manera predominante en la superficie apical o basolateral de la célula (Schülein et al., 1998).

Estos dominios de superficie celular son morfológica, constitutiva y funcionalmente distintos. La superficie apical actúa como barrera de protección entre el exterior y el interior de la célula y contiene transportadores para ingresar pequeñas moléculas. La superficie basolateral, en cambio, está involucrada en la adhesión célula a célula, a través de uniones estrechas o *tight junctions* y uniones de anclaje como desmosomas. Por otro lado, el dominio basolateral esta también comprometido en la unión de célula a matriz, a través de hemidesmosomas y contactos focales. Se supone que las uniones estrechas confinan las proteínas en sus dominios de

membrana apropiados, actuando como barrera en el seno de la bicapa lipídica (Simons y Fuller, 1985; Alberts, 1996).

Además se ha observado una distribución no uniforme de las proteínas que conforman el citoesqueleto en células polarizadas. Este hecho contribuiría a la compartimentalización polarizada de proteínas, ya que el desarrollo de un fenotipo estructural y funcionalmente polarizado es paralelo a la polarización del citoesqueleto (Nelson, 1991).

La expresión apical ha sido observada para receptores A1 de adenosina (Saunders, et al., 1996) y para el receptor de rodopsina (Chuang y Sung, 1998). La expresión basolateral ha sido demostrada, en tanto, para el receptor adrenérgico α_{2A} (Keefer y Limbird, 1993), α_{2B} y α_{2C} (Wozniok y Limbird, 1996), en receptores de TSH, FSH y LH (Beau et al., 1997), receptores purinérgicos P_{2y11} (Zambon et al., 2001) y receptores de vasopresina V1a y V2 (Campos, et al., 2001; Schülein et al., 1998).

Las señales de transporte que determinan localización polarizada en superficie celular de células epiteliales, han sido bien caracterizadas en los dominios citoplasmáticos de proteínas de membrana no relacionadas. En la mayoría de los casos, éstas señales pueden ser del tipo tirosina, tal como fue descrito para el receptor de lipoproteína de baja densidad (Matter et al., 1992) o del tipo dileucina, que fue caracterizado para el receptor Fc IgG (Hunzeker y Fumey, 1994). Para receptores acoplados a proteína G con siete dominios de transmembrana, estas señales no estarían bien definidas, a excepción del receptor de FSH, en donde residuos de tirosina y leucina en el extremo carboxilo terminal contribuyen como señal de destino basolateral (Beau et al., 1998). En el caso del receptor adrenérgico

α_{2a} , el dominio intracelular tres (ICL3) poseería señales de destino hacia el dominio basolateral (Edwards y Limbird, 1999).

Estudios de inmunocitoquímica del receptor V2 en riñón de rata (Nonoguchi et al., 1995) así como, estudios con proteína verde fluorescente (Schülein et al., 1998) y el uso de receptores etiquetados con c-myc en células epiteliales MDCK (Andersen-Beckh et al., 1999) han demostrado su localización predominantemente basolateral. Sin embargo pequeñas cantidades del receptor han sido detectadas en el dominio apical (Schülein et al., 1998; Andersen-Beckh et al., 1999).

Recientemente, se estudió cuales eran los dominios citoplasmáticos del receptor V2 involucrados en el transporte basolateral. Se demostró que el segundo dominio intracelular (ICL2) contiene señales de destino basolateral, mientras que el extremo carboxilo terminal tiene señales de destino apical; en tanto, el tercer dominio intracelular (ICL3) posee señales de retención en el retículo endoplásmico por medio de motivos del tipo RXR (Hermosilla y Schülein, 2001).

En nuestro laboratorio, mediante experimentos de RT-PCR con partidores gen específicos para el receptor V2, hemos clonado, desde riñón de rata, un producto de amplificación de aproximadamente 1.1 Kb del receptor V2 de AVP. El clonamiento y secuenciación demostró que este cDNA corresponde a una isoforma del receptor V2 que se genera por empalme a un sitio alternativo, 76 pb río abajo dentro del tercer exón produciéndose un cambio en el marco de lectura. La nueva isoforma difiere en el extremo C-terminal de la forma renal del receptor V2 y es, a su vez, 31 aminoácidos más corta, generándose un nuevo segmento de transmembrana y un

extremo carboxiterminal completamente distinto. Estos datos coinciden con los encontrados en 1994 por Firsov y colaboradores (Firsov et al., 1994), quienes fueron los primeros en dar evidencia de la existencia de un nuevo tipo de empalme en el receptor V2, que fue denominado V2s, para diferenciarlo del V2 normal (V2L). Nosotros en cambio, hemos designado a esta nueva isoforma como V2b.

Considerando los datos anteriormente mencionados y con la ayuda de un marcador molecular ampliamente utilizado para monitorear proteínas, como lo es la proteína verde fluorescente (GFP), se planteó como hipótesis de trabajo, que la isoforma V2b unida a proteína verde fluorescente, presentaría características funcionales y alcanzaría la membrana plasmática en células polarizadas al igual que los demás receptores de vasopresina.

Por tanto, el objetivo de la presente tesis fue estudiar la distribución subcelular de la isoforma V2b de receptores de vasopresina en células epiteliales polarizadas y determinar características funcionales, para lo cual se cumplieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Construcción del cDNA que codifica para la proteína de fusión pEGFPN1/V2b.
- 2- Expresión estable en células MDCK y expresión pasajera en células CHO-K1 de la quimera V2bGFP.
- 3- Determinación de la distribución subcelular de receptores de vasopresina fusionadas a GFP, mediante microscopía confocal.
- 4- Realización de ensayos funcionales en las líneas celulares estables.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron adquiridos a las siguientes empresas.

Sigma Chemical Co.: Agar, kanamicina, RNasa A, azul de bromofenol, bromuro de etidio, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), bicarbonato de sodio, sulfato de magnesio $MgSO_4$, antibiótico antimicótico (Penicilina 10000 U/ml, Streptomina 10 mg/ml, anfotericina 8 25 ug/ml), tripsina, polilisina, dimetil sulfóxido (DMSO), fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, ácido etilendiamonotetraacético (EDTA), ácido (N(2 hidroxietilpiperazina-N(2 etansulfónico)) (HEPES), acetato de sodio, colorante *trypan blue*, ATP-Tris, ácido 4(dipropilamino) sulfonil benzoico (Probenecid), tampones para calibración (pH 4.0, 7.0 y 10).

Merck, Darmstadt, alemania: Acido clorhídrico, hidróxido de sodio, etanol absoluto, ácido acético glacial, glicerol, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, glucosa, cloroformo, isopropanol.

Gibco BRL, Inc.: Enzima Superscript II RT (200U/ μ l), Oligo dT₁₅ (500 μ g/ μ l), DTT,

Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l) y su tampón 10X, MgCl₂ 50 mM, desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampón endonucleasa (React 2 y 3), Eco-R1(10 U/ μ l), Sal 1 (10 U/ μ l), Xba I (10 U/ μ l), DNAasa I, xilen cianol, Tris, células DH5 α , triptona, extracto de levadura, agarosa ultrapura, agarosa LMP (bajo punto de fusión), marcador de tamaño molecular de 1 Kb DNA Ladder, marcador tamaño molecular 100 pb, Lipofectamina 2000, geneticina (G418), fracción V de albúmina sérica de bovino (BSA).

Partidor sentido (V2FN): 5'GAATTCGGTGTGTTAGGTCATCATCAA 3'

Partidor antisentido (V2RN₂): 5'TCTAGACAGTTGAGCTACAGAGGGTTT 3'

Partidor V2bpEGFPN1: 5'ACGCGTCGACGTAAGAGGAGCTGG 3'

Promega: T4 ligasa y su tampón, Kit Sistema de purificación de midipreparaciones de DNA " *Wizard Plus* ".

Clontech: Vector pEGFPN1

BIO 101, Inc.: Kit de purificación de DNA " *GeneClean* ".

Boehringer-Mannheim: FuGENE 6

Biotecx. USA: Ultraspect RNA

Molecular Probes: Fura-2, marcador lipofílico potenciométrico Di- 8 Anepps

Riadel de Häen: Colorante rojo fenol

Arquimed: Cloruro de potasio (KCl)

Equilab: Isopropanol, tolueno

EM Science : Metanol

Frigosor: Suero bovino fetal

Animal de experimentación: Ratas Holtzman (*Rattus norvegicus*)

3.1.2 Equipos

Termociclador M.J. Research (MiniCycler™), baño termostático Memmert, lámpara UV Camag (Type TL900/U), centrífuga clínica Heraeus Christ (Biofuge A), agitador termostático Lab-Line (Environ Shaker), fuente de poder Bio-Rad (Power PAC200), cámara para geles de agarosa Bio JSP, transiluminador UV Viber-Lourmat, Estufa de cultivo Memmert, cámara fotográfica instantánea Polaroid (DS34), cámara geles Life technologies (modelo 1160), cámara de flujo laminar Nuair 8 (clase II tipo A), baño termostático Kottermann, estufa de cultivo con CO₂ Forma Scientific (Water Jacketed Incubator), microscopio invertido Nikon-TMS, pipeteador automático Drummond, agitador magnético Cole Palmer (Mod. 4658. Stirrer / Hot plate), pHmetro WTW (pH521), centrífuga clínica International Equipment (Mod. CL), agitador Scientific Industries (Vortex-2 Genie), balanza electrónica Shimadzu (321-33557), Balanza analítica Sartorius (LA250S), Microscopio de fluorescencia Zeiss (Axioskop HBO50 con cámara fotográfica MC80), microscopio confocal Micro system Zeiss LSM (axiovert 135M, Laser argón), centrífuga Kubota (8KR-20000T), espectrofotómetro Shimadzu (UV-150-02), bomba de vacío Meduak, espectrofluorímetro Perkin -Elmer (LS50B).

3.2 MÉTODOS:

3.2.1 Clonamiento de isoformas del receptor de vasopresina

3.2.1.1 Purificación de RNA total

Se obtuvo RNA total de riñón de ratas Holtzman (*Rattus norvegicus*). Las ratas se sacrificaron por decapitación y el riñón fue inmediatamente sumergido en nitrógeno líquido. Aproximadamente 110 mg de tejido fueron inmediatamente homogeneizados en ULTRASPECT RNA, 1 ml por cada 100 mg de tejido y procesado siguiendo las instrucciones del fabricante. El homogeneizado resultante fue incubado por 5 min a 4° C para la completa disociación del complejo de nucleoproteínas.

La extracción de RNA propiamente tal, se realizó agregando 0.2 volúmenes de cloroformo para 1 ml del homogeneizado anterior. Posteriormente se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubó en hielo por 5 min, después de lo cual, se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C. Se formaron dos fases: una fase orgánica y otra acuosa, es en esta última en donde se encuentra el RNA, el cual fue precipitado con un volumen de isopropanol igual al obtenido en la fase acuosa, se agitó por 15 seg y se almacenó por 5 min a 4°C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 12000 g (4°C) por 15 min. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó 3 veces con 1 ml de etanol 75 % mezclando y centrifugando por 5 min a 7500 g (4°C). El precipitado de RNA se secó al vacío por 10 min y se disolvió en agua destilada estéril tratada con DEPC.

Se leyó la absorbancia a 260 y 280 nm ($1 \text{ DO}_{260} = 40 \mu\text{g}$ de RNA) contra un blanco de agua estéril tratada con DEPC y se calculó la concentración de RNA total en ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la razón A_{260}/A_{280} .

3.2.1.2 Electroforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído

Para la identificación y separación de fragmentos de RNA, se prepararon geles de agarosa al 0.8% en tampón MOPS 5X (MOPS 0.2 M pH 7.0, acetato de sodio 50 mM, EDTA 5mM pH 8.0) conteniendo formaldehído 2.2M. Se utilizaron 20 μg de RNA en tampón MOPS 5X conteniendo formaldehído y formamida con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio. La muestra se incubó a 55 °C por 15 min. Se utilizó tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0,4% y cianol de xileno 0.4%) en relación 1:10 con respecto al volumen de la muestra . Posteriormente se identificó la integridad del RNA observando el gel por exposición a luz UV en un transluminador.

3.2.1.3 Síntesis de cDNA

El RNA total (5 μg) de riñón de rata se trató con 2 U de DNAsa I libre de RNasa en una mezcla de reacción de 50 μl que contenía 20Mm Tris-HCl pH 8.4, 2mM MgCl_2 y 50mM de KCl. Se incubó a temperatura ambiente por 15 min y se detuvo la reacción agregando 5 μl de 25mM EDTA. La enzima se inactivó calentando a 70°C por 10 min.

El cDNA de isoformas del receptor V2 de rata se obtuvo mediante el método de RT-PCR. Para la síntesis de la primera hebra de cDNA una cantidad de 0.5 µg de RNA total tratado con DNAsa, se incubó con 250 ng de oligo dT a 70 °C por 15 min en un volumen de 12,5 µl. Luego se completó a 20 µl con una mezcla que contenía 50mM Tris-HCl pH 8.3, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.5mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos y 100 U de Superscript II RNAsa H transcriptasa reversa. La reacción se incubó a 42 °C durante 50 min. La enzima se inactivó calentando la mezcla a 70°C por 15 min y colocándola en hielo. El cDNA sintetizado se trató con RNAsa a 0.1 mg/ml y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.2.1.4 Electroforesis en geles de agarosa

Para la identificación y separación de fragmentos de DNA, se prepararon geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Tris 20mM, ácido acético 10mM y EDTA 500µM) con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Se utilizó tampón de carga (glicerol 50%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,5% en TE) en relación 1:6, con respecto al volumen de la muestra y 0,5 µg de estándar de tamaño molecular para DNA de 1 Kb. Los geles se corrieron aproximadamente 30 min a 100 Volt en tampón de corrida TAE 1x y el DNA se observó por exposición del gel sobre el transluminador UV.

3.2.1.5 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa utilizó como templados cDNA V2 de rata y partidores gen específicos:

Partidor sentido (V2FN): 5´GAATTCGGTGTGTTAGGTCATCATCAA 3´

Partidor antisentido (V2RN₂): 5´TCTAGACAGTTGAGCTACAGAGGGTTT 3´

La reacción de amplificación contiene además Tris-HCl 50mM pH 8,3, KCl 50mM , MgCl₂ 1,5mM, 0,2mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 60nM de cada partidor gen específico y 2U de Taq DNA polimerasa y agua destilada estéril para completar un volumen final de 50 µl. Al mismo tiempo se amplificó un control negativo sin templado, utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador y el programa consistió en una etapa previa de denaturación 96° C por 1 min, apareamiento por 1 min a 63°C y extensión por 2 min a 72°C completando 39 ciclos. El producto de amplificación se observó en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X.

3.2.1.6 Purificación del DNA

El producto de amplificación del fragmento que codifica para el receptor V2 normal (V2a) se fraccionó por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión 1% en tampón TAE 1X. Se cortó el gel que contenía el DNA utilizando luz UV de baja intensidad y se procedió a la purificación del DNA siguiendo la metodología del

Kit “ *GeneClean* ”. Al trozo del gel se le agregaron tres volúmenes de NaI, incubándose 5 min a 55 °C en un baño termostático para fundir la agarosa. Luego, se agregaron 6 µl de matriz de sílice en agua y se incubó la mezcla por 5 min en hielo, agitando suavemente cada cierto tiempo. Se centrifugó a 13000 x g 30 seg y se lavó el complejo matriz de sílice/DNA, 3 veces con 500 µl de solución “*New Wash*”(Tris-HCl 20mM pH 7.2, NaCl 200mM, EDTA 2mM, etanol 50%), centrifugándose entre cada lavado a 13000 x g por 30 seg y descartándose el sobrenadante. Posteriormente, se eluyó el DNA en 10 µl de agua destilada estéril y se incubó la mezcla a 50 °C por 5 min. Por último, se centrifugó a 13000 x g por 30 seg y se extrajo el sobrenadante conteniendo el DNA.

El producto de amplificación de la isoforma corta de receptores V2 (V2b) era insuficiente como para clonarla directamente, por lo que se fraccionó en un gel de bajo punto de fusión cortándose la banda de interés. El trozo del gel se incubó a 55°C por 10 min y se utilizó 2 µl como templado para posteriormente reamplificarlo siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente en el apartado 3.2.1.5.

3.2.1.7 Ligación del fragmento codificante del receptor V2b al vector pGEM-T

El inserto del receptor V2b se clonó en el vector pGEM-T, utilizando el protocolo provisto por Promega para el Kit de clonamiento “ *pGEM^R T- Easy Vector System I* ”. La reacción de ligación consistió en 5 µl del tampón de ligación rápida 2X (T₄ DNA ligasa), 50 ng pGEM-T (3018pb linealizado), 2 µl del producto de amplificación y 1U

de T₄ DNA ligasa en un volumen final de 10 µl, completado con agua destilada estéril. La mezcla se incubó 24 h a 4°C.

3.2.1.8 Transformación de células competentes

La transformación de células DH5α se realizó agregando 10 ng de mezcla de ligación a un tubo que contenía 50 µl de células competentes. Se incubó en hielo por 30 min y posteriormente, las células fueron sometidas a un shock térmico 20 seg a 37°C. Luego fueron dejadas en hielo por 2 min y se incubaron a 37°C por 1h con 950 µl de medio LB (Tryptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l pH 7.5). Se centrifugaron las células 5 min a 6000 x g y el sedimento fue resuspendido en 100 µl de medio LB. Finalmente, se sembraron placas de agar LB–kanamicina 70µg/µl (agar 15 g/l) y se incubaron a 37 °C por 24 h.

3.2.1.9 Purificación del DNA plasmidial a pequeña escala

Se aislaron colonias únicas de la placa LB–kanamicina y se cultivaron en 5 ml de medio LB–kanamicina 70 µg/µl a 37°C por 24 h a 225 rpm en un agitador. Posteriormente, se centrifugó 1.5 ml de cultivo a 13000 x g por 2 min y el precipitado fue resuspendido en 300 µl de solución TENS (NaOH 10N, SDS 10 % en TE 1X pH 7.5) recién preparada. Luego, se agregó 150 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se centrifugó a 13000 x g por 2 min. Al sobrenadante se le agregaron 900 µl de etanol

100% mezclando por inmersión y centrifugando por 10 min a 13000 x g. El precipitado se lavó 3 veces con 500 μ l de etanol 70 %. Finalmente se secó el precipitado y se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril.

Una alícuota de 10 μ l de DNA plasmidial fue digerida a 37°C por 12 h con 10 U de Eco RI y Sal I, utilizando 3 μ l de tampón común para las endonucleasas, RNasa A 300 μ g/ μ l y agua destilada estéril para completar un volumen final de 30 μ l. La liberación del inserto se verificó en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X.

3.2.1.10 Purificación del DNA plasmidial a mediana escala

El protocolo utilizado fue el recomendado por Promega para el Kit de purificación de midipreparaciones de DNA "*Wizard Plus*". Se cultivaron 100 μ l de la midipreparación a 37 °C por 24 h a 225 rpm en un agitador, en medio LB-kanamicina 70 μ g/ μ l. Luego, se centrifugó el cultivo a 10000 x g por 10 min a 4°C y se resuspendió el precipitado en 3 ml de solución de resuspensión (Tris – HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 8.0 y RNasa A 100 μ g/ml). Se agregó 3ml de solución de lisis (NaOH 200 mM, SDS 1%), mezclando por inversión. Posteriormente, se adicionó 3 ml de solución de neutralización (acetato de potasio 1.32 M pH 4.8) y nuevamente se mezcló por inversión. Se centrifugó el lisado a 14000 x g por 15 min a 4°C y se extrajo el sobrenadante para agregarle 10 ml de resina purificadora de DNA. Se transfirió la resina a la minicolumna, se aplicó vacío para empacarla y se

efectuaron 3 lavados con 10 ml de solución de lavado cada vez (etanol 55%, acetato de potasio 80 mM, Tris-HCl 8.3 mM pH 7.5 y EDTA 40 μ M). Se secó al vacío la columna por 30 seg , se cortó y se colocó en un tubo *ependorf* para centrifugar a 10000 x g por 2 min. Finalmente, se colocó la minicolumna en un tubo nuevo, se agregaron 200 μ l de agua destilada estéril y se centrifugó 5 min a 10000 x g.

3.2.1.11 Cuantificación de DNA plasmidial

La concentración de DNA obtenida, se determinó midiendo absorbancia a 260 nm a diluciones de las muestras en un espectrofotómetro Shimatzu UV– 150–02. Para el cálculo de la concentración, se consideró que 1 unidad de absorbancia correspondía a 50 μ g / ml de DNA.

3.2.1.12 Subclonamiento del receptor V2b de rata en el plasmidio pcDNA3.

Se efectuaron digestiones del fragmento codificante del receptor V2b de rata y del vector pcDNA3 utilizando en cada una 2 μ g de DNA, 3 μ l de tampón común a las endonucleasas utilizadas (Tris-Hcl 50mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50mM), 10U de Eco RI y Xba I y agua destilada estéril para completar un volumen final de 30 μ l. La mezcla se incubó a 37°C por 24 h, observándose el DNA digerido en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Las digestiones del receptor V2b de rata y del plasmidio pEGFPN1 fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en

TAE 1X según el protocolo descrito en métodos 3.2.1.6, seguido de reacción de ligación, transformación de células competentes y purificación plasmidial a pequeña y mediana escala (métodos 3.2.1.8, 3.2.1.9, 3.2.1.10), obteniéndose de esta manera, el receptor fusionado en un plasmidio de expresión eucariótica.

3.2.2 Subclonamiento del fragmento codificante del receptor V2b de rata en el plasmidio pEGFPN1

Se subclonó el fragmento codificante del receptor V2b de riñón de rata desde el plasmidio pcDNA3 al vector pEGFPN1 mediante el método de PCR. Se utilizaron partidores específicos de la secuencia de la isoforma V2b de rata a una concentración final de 5 μ M. El partidor sentido V2FN incorporó un sitio de restricción Eco RI y el antisentido V2bpEGFPN1 incorporó un sitio de restricción Sal I, además de eliminar el codón de término, dejando al receptor V2b y a la GFP en el mismo marco de lectura. La reacción de amplificación utilizó además 1 μ g de pcDNA3/V2b, tampón PCR 1X, MgCl₂ 50 mM, dNTP 50 mM, 0.5 U de Taq DNA polimerasa y agua destilada estéril para completar un volumen final de 50 μ l. El programa consistió en una primera etapa de denaturación a 95°C por 2 min y 34 ciclos de 94°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 1 min 45 seg. El producto de amplificación se observó en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X.

3.2.2.1 Digestión del receptor V2b de rata y del plasmidio pEGFPN1

Las digestión del fragmento codificante del receptor V2b de rata y del vector pEGFPN1 se efectuaron utilizando en cada una 2 μg de DNA, 3 μl de tampón común a las endonucleasas utilizadas (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl_2 10 mM, NaCl 50 mM), 10U de Eco RI y Sal I y agua destilada estéril para completar un volumen final de 30 μl . La mezcla se incubó a 37°C por 24 h, observándose el DNA digerido en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

La digestión del fragmento V2b de rata y del pEGFPN1 fueron fraccionadas por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en TAE 1X según el protocolo descrito en métodos 3.2.1.6.

3.2.2.2 Ligación del fragmento codificante del receptor V2b al vector pEGFPN 1

La reacción de ligación del extremo 3' del fragmento codificante del receptor V2b al extremo 5' del fragmento codificante de la GFP en el vector pEGFPN1 se efectuó utilizando una razón volumen vector/inserto de 1:2, 1U de T4 DNA ligasa, 1 μl de tampón de ligasa (Tris-HCl 300 mM pH 7.8, MgCl_2 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM) y agua destilada estéril para completar un volumen final de 20 μl . La mezcla se incubó a 4°C por 24 h.

Se transformaron células competentes DH5 α (métodos 3.2.1.8). Posteriormente se realizó la purificación del DNA plasmidial a pequeña y mediana escala según lo descrito en métodos 3.2.1.9 y 3.2.1.10.

3.2.2.3 Análisis de restricción

El análisis de restricción de las distintas construcciones se llevó a cabo digiriendo 1 µg de DNA con 10 U de cada endonucleasa, 3 µl de tampón común a las endonucleasa utilizadas y agua destilada estéril para completar un volumen final de 30 µl. La mezcla se incubó a 37°C por 12 h y el producto de la digestión se observó en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X.

3.2.3 Distribución subcelular y funcionalidad de la isoforma V2b en células MDCK

3.2.3.1 Cultivos celulares

Se cultivaron células MDCK en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado y 1 % de antibiótico–antimicótico, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Cada 3 a 4 días se subcultivaron las células utilizando tripsina (tripsina 0.25 %, EDTA 1 mM en PBS pH 7.8) 5 min a 37°C.

3.2.3.2 Transfecciones estables

Las transfección de células MDCK con la proteína de fusión pEGFPN1-V2b de rata, se realizó utilizando el reactivo Fugene 6 según las instrucciones del fabricante.

Se usó una razón masa DNA (μg) / volumen Fugene (μl) de 2:3. Primero se diluyó el Fugene 6 en medio de cultivo libre de suero a $100 \mu\text{l}$ del volumen final y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Luego, se agregó lentamente el reactivo de transfección diluido a un tubo conteniendo el DNA y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó la mezcla a placas de MDCK de 100 mm de diámetro, cultivadas a 50–80 % de confluencia. El proceso de selección fue iniciado a las 48 h de transfección utilizando genitocina de 700 a 1000 $\mu\text{g/ml}$, manteniéndose en cultivo por 2 semanas, posterior a las cuales fueron aisladas por medio de cilindros de clonamiento. En tanto, la línea estable expresando el receptor V1a unido a GFP en células MDCK fue provista por el mismo laboratorio.

Para la transfección pasajera de células CHO-K1 con las construcciones pEGFPN1, pEGFPN1-V1a y pEGFPN1-V2b se utilizó el reactivo de transfección lipofectamina 2000; se mezclaron 4 μg de DNA y 10 μl del reactivo a un volumen final de 500 μl de DMEM base, incubándose por 30 min a temperatura ambiente. La mezcla fue agregada a placas de 35 mm de diámetro de células CHO-K1 cultivadas a 95% de confluencia con cubreobjetos en su interior. Transcurridas las 48 h de transfección, las muestras fueron montadas y preparadas para su observación por microscopía confocal.

3.2.3.3 Distribución subcelular de la isoforma V2b de receptores de vasopresina

Se sembraron placas de 35 mm que contenían cubreobjetos redondos con polilisina, utilizando las líneas estables obtenidas de las transfecciones con la proteína verde fluorescente y las proteínas de fusión pEGFPN1-V1a y pEGFPN1-V2b, así también como las transfecciones pasajeras de estas mismas quimeras, tanto en células MDCK como en células CHO-K1. Luego de dos semanas de cultivo a confluencia, se realizaron estudios de localización subcelular utilizando un marcador de membrana plasmática lipofílico denominado Di-8ANEPPS. Las preparaciones, fueron lavadas 2 veces con tampón Krebs Ringer Hepes (NaCl 136 mM, HEPES 10mM, KCl 4.7mM, MgSO₄ 1.25 mM, CaCl₂ 1.25mM y glucosa 1.25 mM) e incubadas con la sonda lipofílica a una concentración de 1 μ M por 5 min a 4°C y en oscuridad. Las preparaciones se lavaron nuevamente 2 veces con tampón Krebs Ringer Hepes (KRH) y fueron montadas en una cámara especialmente diseñada para la observación de células vivas en microscopio confocal.

3.2.3.4 Movilización de calcio

Células MDCK, células A-10 y líneas estables obtenidas de las transfecciones con las construcciones pEGFPN-1/V1a y pEGFPN-1/V2b de rata en células MDCK, se cultivaron a 70% de confluencia en placas de 100 mm de diámetro. Luego se soltaron con 4 ml de tripsina por 10 min y espátula, completando un volumen final de 10 ml con DMEM completo. A 25 μ l de mezcla se les agregó 75 μ l de colorante azul

tripano, aplicándose 12 μ l de esta solución a una cámara de *Neubauer* para el conteo de células.

Paralelamente, se centrifugaron los 10 ml de células a 100 x g por 5–10 min, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en tampón fisiológico (NaCl 140mM, KCl 4 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, glucosa 5mM, HEPES pH 7.4 20mM, probenecid 1 mM y BSA 1 mg/ml) para así tener finalmente 10⁷ células/ml. Luego, se incubaron las células 30 min a temperatura ambiente y oscuridad, en presencia de FURA-2 2 mM, posterior a las cuales se lavaron 2 veces con tampón fisiológico, centrifugándose 5 a 10 min a 100 x g. Por último, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en tampón fisiológico para conservar 10⁷ células/ml.

La medición de calcio intracelular se realizó en un espectrofluorímetro, a 37°C, colocándose en una cubeta de cuarzo 2 ml de mezcla a una concentración aproximada de 10⁶ células / ml en agitación constante. La fluorescencia emitida por el agente acomplejante unido a calcio se detectó utilizando una medida ratiométrica en la cual se utilizaron dos longitudes de onda de excitación a 340nm y 380 nm y una longitud de onda de emisión a 510 nm, calculándose de ésta manera la razón de 340/380 nm. Luego de la estabilización de la línea basal se agregó en experimentos individuales Arg⁸ AVP 100 nM y ATP 100 μ M como control positivo.

4. RESULTADOS

4.1 Clonamiento de isoformas de receptores V2 de vasopresina

4.1.1 Gen del receptor V2 de vasopresina y diseño de partidores

En la figura siguiente se detalla la estructura del gen del receptor V2 de AVP de rata. Comprende tres exones y dos intrones pequeños, el primer exón es muy corto y prácticamente es el segundo exón el que codifica para cerca del 80% del receptor V2. El tercer exón en cambio, codifica para el séptimo dominio de transmembrana (Seibold et al., 1992).

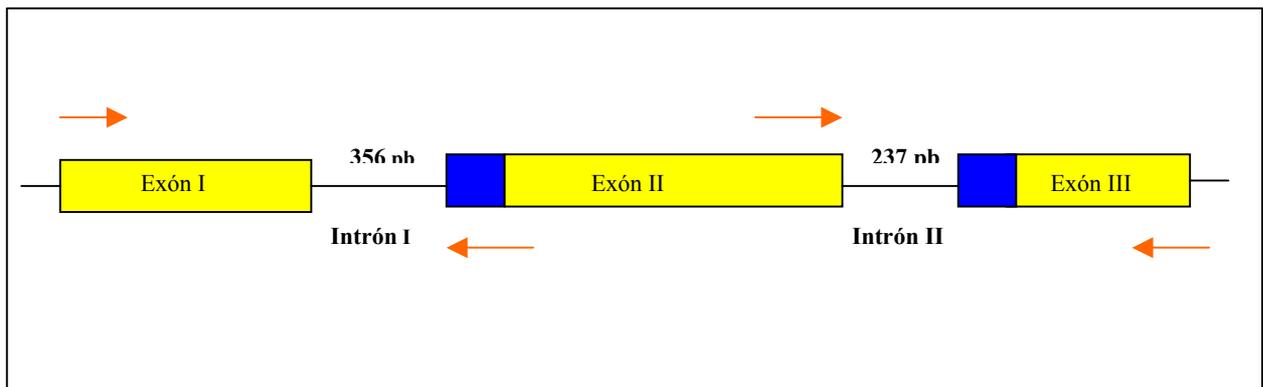


Figura 1: Esquema del gen del receptor V2 de vasopresina: En el esquema superior se indica la posición de los partidores gen específicos utilizados (flechas), además, la posición de los sitios consenso aceptores de empalmes (recuadros azules).

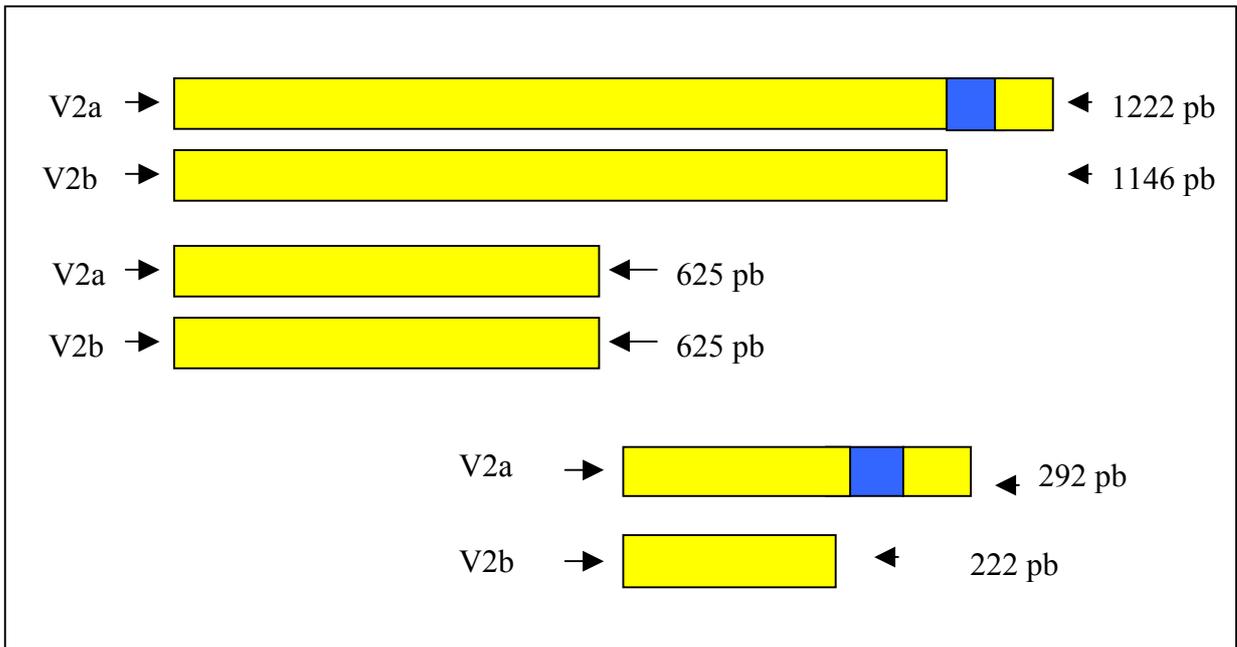


Figura 2: Diseño de partidores: En el esquema superior se detalla la combinación de partidores, la posición y el tamaño molecular de los productos de amplificación por RT-PCR deducidos a partir de la secuencia del gen. Se destaca los fragmentos esperados para el receptor V2a (forma larga y normal) y para la nueva isoforma V2b (forma corta).

Según el esquema mostrado en la figura 2, el receptor V2a posee 1222 pb, es decir, 76 nucleótidos, más, que la isoforma corta denominada V2b, que consta de 1146 pb. Además se concluye que los fragmentos esperados difieren en tamaño, obteniéndose distintos fragmentos por RT-PCR. Es así, como para el receptor V2a se obtienen fragmentos de 625 pb y 292 pb a diferencia de la isoforma V2b en donde se obtienen fragmentos de 625 pb y 222 pb.

4.1.2 Obtención de RNA total de riñón de rata

Con el objetivo de comprobar la correcta integridad del RNA total de riñón de rata se realizó una electroforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído. Como se muestra en la figura 3 se obtuvieron las dos bandas correspondientes a RNA ribosomal 18S y 28S.

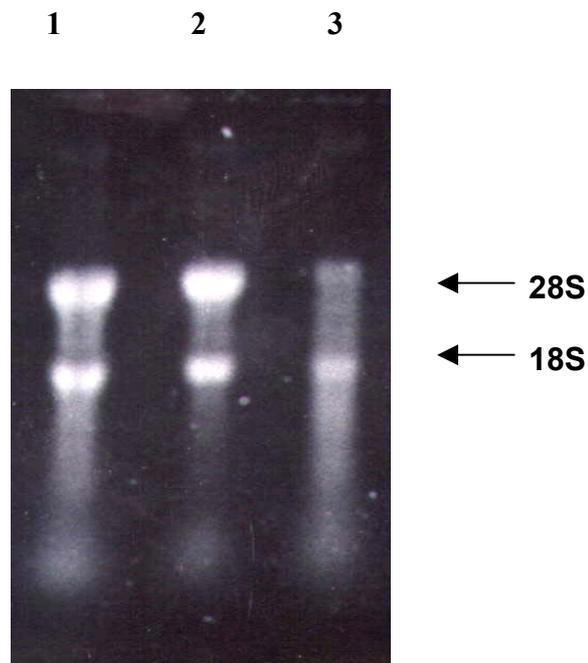


Figura 3: Electroforesis de RNA total de riñón de rata: Gel de agarosa 1.2 % conteniendo formaldehído. Carril 1,2 y 3 corresponden a RNA ribosomal de distintas preparaciones de riñón de rata. Las flechas indican RNA ribosomal 18S y 28S

4.1.3 Amplificación del cDNA de receptores V2 de Vasopresina de rata

En la amplificación del cDNA de receptores V2 de vasopresina se utilizó RNA total de riñón de rata, ya que según la literatura es el tejido en donde mayoritariamente se expresa este tipo de receptor (Guillón et al., 1982).

En la figura 4 se presenta una electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR, utilizando los partidores gen-específicos V2FN y V2RN₂ y el cDNA total de riñón de rata como templado. En las condiciones de la reacción de amplificación, se obtienen dos bandas que corresponden a un producto de amplificación de aproximadamente 1100 y 1200 pb comparado con el estándar de tamaño molecular 100 pb. La banda a la altura de 1200 pb corresponde al receptor V2a, mientras que la banda ubicada aproximadamente a 1100 pb es atribuida a la isoforma V2b. Se observa además, que la intensidad de las bandas es distinta, obteniéndose un producto de amplificación mayoritario para la isoforma V2a que para su similar V2b.

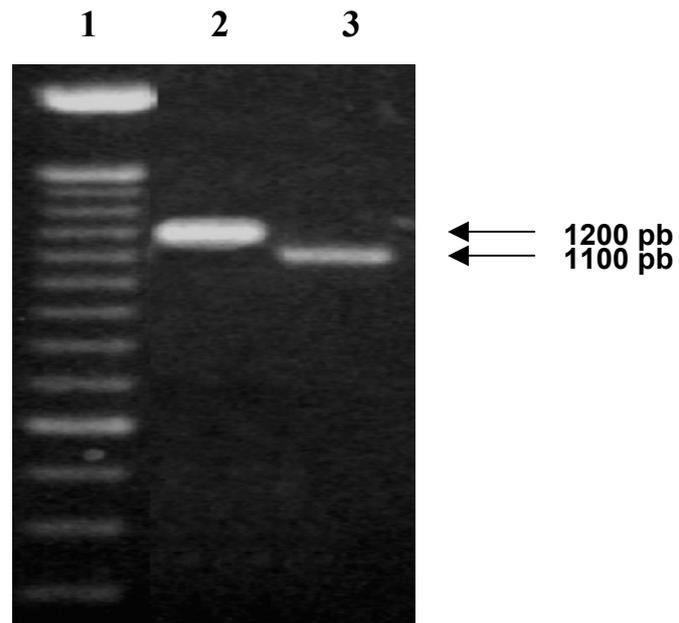


Figura 4: Amplificación por RT-PCR de transcritos para los receptores V2 de vasopresina: Electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de tamaño molecular 100 pb, Carril 2: Amplificación cDNA total de riñón de rata V2a, Carril 3: Amplificación cDNA de riñón de rata V2b.

4.1.4 Alineamientos de las secuencias nucleotídica y aminoacídicas deducidas

Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pGem T de Promega según el protocolo descrito en métodos 3.2.1.7 y secuenciados en ambos sentidos por el método didesoxi, usando los partidores sp6 y T7.

Al comparar la secuencia nucleotídica de los receptores V2a y V2b se puede observar que la isoforma V2b es más corta que el V2a. Esto se debe a que en el receptor V2b se produce un empalme en el tercer exón, 76 pb más abajo que el empalme producido en el receptor V2a. Esto produce, además de la carencia de 76 pares de bases, un corrimiento en el marco de lectura, dando como resultado una proteína cuya parte carboxiterminal es más corta y completamente diferente, comprometiendo al tercer dominio extracelular, al séptimo dominio de transmembrana y al carboxilo terminal intracelular. De este modo se origina un receptor de 339 aá a diferencia del V2a que posee 371 aá.

	1				50
CDS_V2A	ATGCTCTCCG	TGTCTACCGT	GTCCGCTGTG	CCTGGGCTCT	TTTCACCCCC
CDS_V2B	ATGCTCTCCG	TGTCTACCGT	GTCCGCTGTG	CCTGGGCTCT	TTTCACCCCC
	51				100
CDS_V2A	TAGCTCTCCC	AGCAACAGCA	GCCAGGAGGA	ACTACTGGAT	GACCGAGACC
CDS_V2B	TAGCTCTCCC	AGCAACAGCA	GCCAGGAGGA	ACTACTGGAT	GACCGAGACC
	101				150
CDS_V2A	CGCTGCTAGT	CCGGGCTGAA	CTGGCCCTGC	TATCTACAAT	TTTTGTGGCT
CDS_V2B	CGCTGCTAGT	CCGGGCTGAA	CTGGCCCTGC	TATCTACAAT	TTTTGTGGCT
	151				200
CDS_V2A	GTGGCCTTGA	GCAATGGCCT	AGTGCTGGGG	GCCCTAATAC	GGCGGGGCCG
CDS_V2B	GTGGCCTTGA	GCAATGGCCT	AGTGCTGGGG	GCCCTAATAC	GGCGGGGCCG
	201				250
CDS_V2A	GCGTGGACGC	TGGGCACCCA	TGCATGTCTT	CATCAGTCAT	TTGTGCCTGG
CDS_V2B	GCGTGGACGC	TGGGCACCCA	TGCATGTCTT	CATCAGTCAT	TTGTGCCTGG
	251				300
CDS_V2A	CTGACCTGGC	TGTGGCTCTG	TTTCAAGTGC	TACCCAGCT	GGCTTGGGAT
CDS_V2B	CTGACCTGGC	TGTGGCTCTG	TTTCAAGTGC	TACCCAGCT	GGCTTGGGAT
	301				350
CDS_V2A	GCCACTGACC	GCTTCCATGG	CCCTGATGCC	CTGTGTCGGG	CCGTCAAGTA
CDS_V2B	GCCACTGACC	GCTTCCATGG	CCCTGATGCC	CTGTGTCGGG	CCGTCAAGTA
	351				400
CDS_V2A	CCTGCAGATG	GTGGGCATGT	ATGCCTCCTC	CTACATGATC	CTGGCCATGA
CDS_V2B	CCTGCAGATG	GTGGGCATGT	ATGCCTCCTC	CTACATGATC	CTGGCCATGA
	401				450
CDS_V2A	CACTAGACCG	CCATCGTGCC	ATCTGCCGCC	CTATGCTAGC	ATACCGCCAT
CDS_V2B	CACTAGACCG	CCATCGTGCC	ATCTGCCGCC	CTATGCTAGC	ATACCGCCAT
	451				500
CDS_V2A	GGAGGTGGGG	CTCGCTGGAA	CAGGCCAGTG	CTGGTGGCCT	GGGCCTTCTC
CDS_V2B	GGAGGTGGGG	CTCGCTGGAA	CAGGCCAGTG	CTGGTGGCCT	GGGCCTTCTC
	501				550
CDS_V2A	ACTCCTTCTC	AGCCTGCCTC	AGCTCTTCAT	CTTTGCTCAG	CGTGATGTGG
CDS_V2B	ACTCCTTCTC	AGCCTGCCTC	AGCTCTTCAT	CTTTGCTCAG	CGTGATGTGG
	551				600
CDS_V2A	GAAATGGCAG	TGGGGTGTTT	GATTGCTGGG	CCCGATTGTC	AGAACCATGG
CDS_V2B	GAAATGGCAG	TGGGGTGTTT	GATTGCTGGG	CCCGATTGTC	AGAACCATGG
	601				650
CDS_V2A	GGCCTTCGTG	CCTATGTCAC	CTGGATTGCC	TTGATGGTGT	TTGTGGCACC
CDS_V2B	GGCCTTCGTG	CCTATGTCAC	CTGGATTGCC	TTGATGGTGT	TTGTGGCACC
	651				700
CDS_V2A	TGCCCTAGGC	ATTGCTGCCT	GTCAGGTCT	TATCTCCGG	GAGATACACG
CDS_V2B	TGCCCTAGGC	ATTGCTGCCT	GTCAGGTCT	TATCTCCGG	GAGATACACG
	701				750
CDS_V2A	CCAGTCTGGT	GCCAGGGCCA	TCCGAGAGGG	CAGGGAGGCG	CCGCAGAGGG
CDS_V2B	CCAGTCTGGT	GCCAGGGCCA	TCCGAGAGGG	CAGGGAGGCG	CCGCAGAGGG
	751				800
CDS_V2A	CGCCGGACAG	GAAGCCCCAG	CGAGGGAGCA	CATGTATCAG	CAGCCATGGC
CDS_V2B	CGCCGGACAG	GAAGCCCCAG	CGAGGGAGCA	CATGTATCAG	CAGCCATGGC
	801				850
CDS_V2A	CAAGACCGTG	AGGATGACAC	TGGTGATTGT	GATTGTCTAC	GTGCTATGCT
CDS_V2B	CAAGACCGTG	AGGATGACAC	TGGTGATTGT	GATTGTCTAC	GTGCTATGCT
	851				900
CDS_V2A	GGGCACCCTT	CTTCCTCGTG	CAGCTGTGGG	CAGCGTGGGA	TCCGGAAGCT
CDS_V2B	GGGCACCCTT	CTTCCTCGTG	CAGCTGTGGG	CAGCGTGGGA	TCCGGAAGCT
	901				950

```

CDS_V2A CCTCTGGAAA GACCCCCCTT TGTGTTGCTC ATGCTGCTGG CTAGCCTTAA
CDS_V2B CCTCTGGAAA .....
951 1000
CDS_V2A CAGCTGTACC AACCCCTGGA TCTATGCTTC CTTCAGTAGC AGTGTCTCCT
CDS_V2B ..... TAGC AGTGTCTCCT
1001 1050
CDS_V2A CGGAGTTGCG TAGCCTGCTT TGCTGTGCTC AGAGGCACAC CACACACAGC
CDS_V2B CGGAGTTGCG TAGCCTGCTT TGCTGTGCTC AGAGGCACAC CACACACAGC
1051 1100
CDS_V2A CTGGGTCCTC AAGATGAATC CTGTGCCACA GCCAGCTCCT CTTTGATGAA
CDS_V2B CTGGGTCCTC AAGATGAATC CTGTGCCACA GCCAGCTCCT CTTTGATGAA
1101 1116
CDS_V2A GGATACACCC TCCTGA
CDS_V2B GGATACACCC TCCTGA

```

Fig 5: Alineamiento de la secuencia nucleotídica deducida para receptores V2 de vasopresina: Los nucleótidos marcados en color gris representan secuencias consensos para ambos receptores, mientras que la zona mostrada en amarillo corresponde a la delección de 76 nucleótidos que se produce en la nueva isoforma V2b producto del empalme alternativo al tercer exón.

	1				50
V2A	MLLVSTVSAV	PGLFSPSSP	SNSSQEELLD	DRDPLLVRAE	LALLSTIFVA
V2B	MLLVSTVSAV	PGLFSPSSP	SNSSQEELLD	DRDPLLVRAE	LALLSTIFVA
	51				100
V2A	VALSNGLVLG	ALIRRGRRGR	WAPMHVFISH	LCLADLAVAL	FQVLPQLAWD
V2B	VALSNGLVLG	ALIRRGRRGR	WAPMHVFISH	LCLADLAVAL	FQVLPQLAWD
	101				150
V2A	ATDRFHGPDA	LCRAVKYLQM	VGMYASSYMI	LAMTLDRHRA	ICRPMLAYRH
V2B	ATDRFHGPDA	LCRAVKYLQM	VGMYASSYMI	LAMTLDRHRA	ICRPMLAYRH
	151				200
V2A	GGGARWNRPV	LVAWAFSLLL	SLPQLFIFAQ	RDVGNGSGVF	DCWARFAEPW
V2B	GGGARWNRPV	LVAWAFSLLL	SLPQLFIFAQ	RDVGNGSGVF	DCWARFAEPW
	201				250
V2A	GLRAYVTWIA	LMVFPVAPALG	IAACQVLIFR	EIHASLVPGP	SERAGRRRRG
V2B	GLRAYVTWIA	LMVFPVAPALG	IAACQVLIFR	EIHASLVPGP	SERAGRRRRG
	251				300
V2A	RRTGSPSEGA	HVSAAMAKTV	RMTLVIVIVY	VLCWAPFFLV	QLWAAWDPEA
V2B	RRTGSPSEGA	HVSAAMAKTV	RMTLVIVIVY	VLCWAPFFLV	QLWAAWDPEA
	301				350
V2A	PLERPPFVLL	MLLASLNSCT	NPWIYASFSS	SVSSELRSLL	CCAQRHTTHS
V2B	PLEIAVSPRS	CVACFAVLRG	TPHTAWVLKM	NPVPQPAPL
	351		371		
V2A	LGPQDESCAT	ASSSLMKDTP	S		
V2B			

Figura 6: Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida para receptores V2 de vasopresina: En gris se aprecia aquellos aminoácidos idénticos para las dos isoformas. El cambio en el marco de lectura para la isoforma V2b es marcado en color amarillo.

4.2 Subclonamiento del fragmento codificante de receptores V2 de rata

Se realizó el subclonamiento del fragmento codificante de la isoforma V2b de riñón de rata en el vector pEGFPN1 mediante el método de PCR según lo descrito en métodos 3.2.2.

Con el objetivo de comprobar la correcta construcción del plasmidio pGFPN1-V2b, se realizó un análisis de restricción del DNA plasmidial purificado (fig. 7) según el procedimiento descrito en métodos 3.2.2.3.

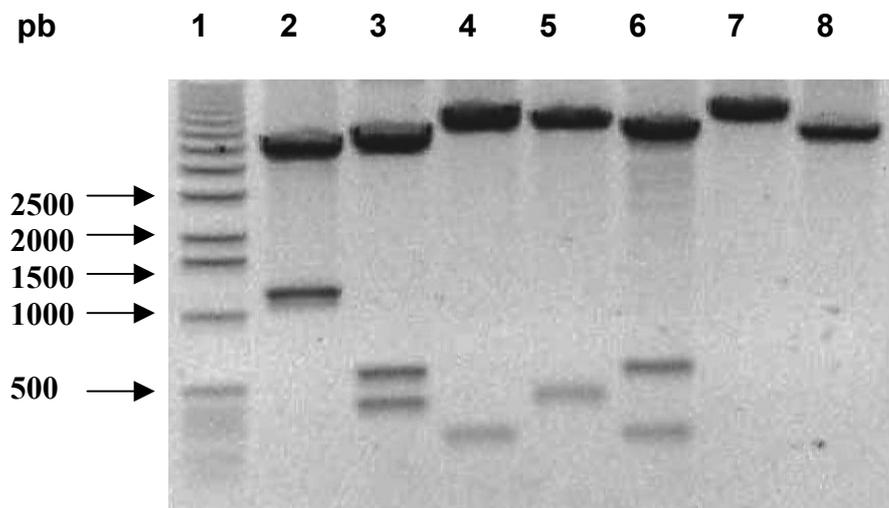


Fig. 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del análisis de restricción de la proteína de fusión pEGFPN1/V2b. Carril 1: Estándar de tamaño molecular 1 Kb *DNA Ladder*. Carril 2: Digestión con EcoRI y Sal I. Carril 3: Digestión con Apa I. Carril 4: Digestión con BamHI. Carril 5: Digestión con Pst I y EcoRI. Carril 6: Digestión con Pst I y BamHI. Carril 7: Digestión del clon con EcoRI. Carril 8: Digestión plasmidio pEGFPN1 con EcoRI.

Según lo esperado, al digerir la proteína de fusión pEGFPN1/V2b con las enzimas de restricción EcoRI y Sall, se aprecia la liberación del fragmento codificante de la isoforma V2b de receptores V2 de vasopresina de aproximadamente 1100 pb. Al utilizar la endonucleasa Apa I se observa la liberación de dos fragmentos de aproximadamente 500 y 300 pb lo que concuerda con los fragmentos esperados. En la digestión con BamHI se observa la liberación de un fragmento de 150 pb aproximadamente. En tanto, al digerir con las enzimas Pst I y EcoRI se libera un fragmento de aproximadamente 300 pb. Por su parte, en la digestión con las enzimas Pst I y BamHI se aprecian dos bandas a la altura de 150 pb. Finalmente al digerir el plasmidio pEGFPN1 y el clon pGFPN1/V2b con la endonucleasa EcoRI se linearizaron ambos. Estos resultados apoyan la idea de que la secuencia nucleotídica que codifica para el receptor V2b ha sido insertado correctamente en el plasmidio de GFP.

Lo que no se podía inferir a través del mapa de restricción era si producto de la amplificación por PCR, realizada con la enzima Taq polimerasa, ésta podría haber introducido alguna variación en la secuencia nucleotídica. Por ésta razón se secuenció la construcción completa, incluyendo tanto la zona de fusión a GFP como la secuencia del receptor. Los resultados de la secuenciación realizada en EE.UU. indicaron que la secuencia nucleotídica de la isoforma V2b unida a GFP poseía una mutación en el nucleótido 115 correspondiente al aminoácido 39, en la cual ocurría una substitución de alanina por prolina. Este aá se encuentra ubicado dos unidades aminoacídicas antes del comienzo del primer segmento transmembrana del receptor V2, sitio que no estaría involucrado ni en la llegada a membrana plasmática ni en la unión a la hormona como tampoco en la unión a proteína G.

4.3 Transfecciones estables en células polarizadas MDCK y células no polarizadas CHO-K1

Se efectuaron transfecciones estables en células MDCK con el plasmidio pEGFPN-1 (clon GFP) y con la proteína de fusión pEGFPN1-V2b (clon V2bGFP) según protocolo descrito en métodos 3.2.3.2. Por su parte, la proteína de fusión pEGFPN1/V1a (clon V1aGFP) expresada en células MDCK (Campos , et al., 2001) fue utilizada como control de receptores de vasopresina para el estudio de localización subcelular de la nueva isoforma, puesto que se ha demostrado que éste receptor se localiza en el dominio basolateral.

También fueron transfectadas de forma pasajera células CHO-K1 con el plasmidio pEGFPN1 y con las proteínas de fusión V1aGFP y V2bGFP.

La determinación de la concentración de geniticina a utilizar en la selección de los clones se realizó mediante una curva de sensibilidad al antibiótico. Para ello se cultivaron células MDCK con concentraciones crecientes de geniticina, estableciéndose que la concentración mínima necesaria para obtener muerte celular en células MDCK era de 700 µg/ml.

Luego de la selección y del aislamiento individual de los clones, se observaron éstos mediante microscopía de fluorescencia, concluyéndose que poseían diferente intensidad de fluorescencia, por lo cual, para experimentos posteriores se prefirió aquellos clones que presentaban una mayor intensidad de fluorescencia.

4.4 Localización subcelular de la isoforma V2b de receptores de vasopresina

Se realizaron estudios de localización subcelular del receptor V2bGFP utilizando microscopía laser confocal. Las células control fueron transfectadas con el plasmidio pEGFPN1 y con el constructo V1aGFP además de tener células no transfectadas. La preparación y montaje de muestras se realizó según el protocolo indicado en métodos 3.2.3.3.

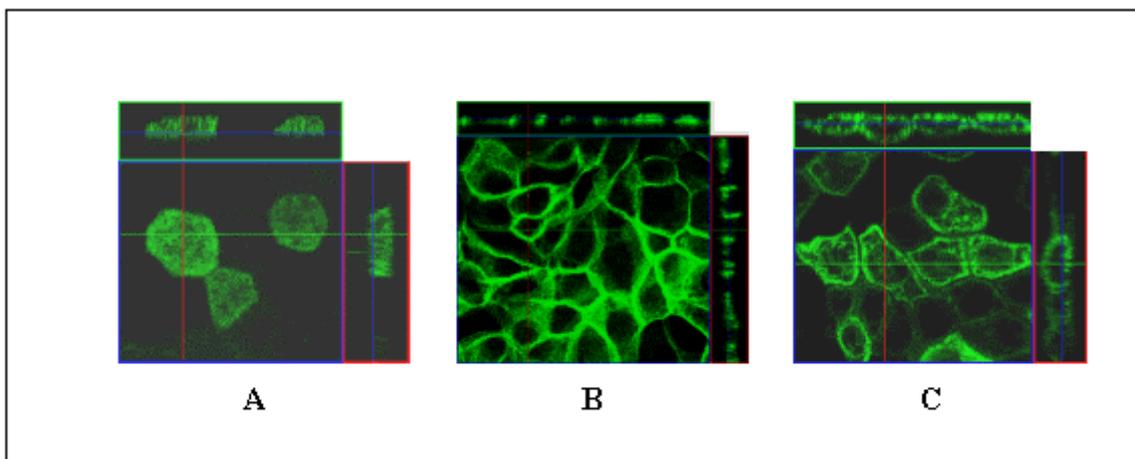


Figura 8: Localización de receptores de vasopresina acoplados a GFP en células MDCK confluentes. Clones de células MDCK fueron crecidos sobre cubreobjetos redondos para su observación in vivo, A. Células transfectadas con el plasmidio pEGFPN-1, B. Células transfectadas con la proteína de fusión V1aGFP y en C. Células transfectadas con la isoforma V2b unida a GFP.

Las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal permitieron observar que el clon V1a-GFP, que fue utilizado como control, se encuentra predominantemente localizado a nivel de la membrana plasmática. El clon V2b-GFP, en cambio, presentó una distribución diferente, esto es, se distribuyó tanto a nivel de membrana plasmática como en el interior de la célula. Se utilizó como control también la GFP la cual presentó una localización principalmente intracelular y nuclear.

Además, se utilizó una sonda potenciométrica de tipo lipofílica, marcadora de membrana plasmática denominada Di-8 ANEPPS. Primeramente se hizo un control en células CHO expresando pasajeramente la proteína verde fluorescente para determinar si la sonda poseía especificidad sobre la membrana plasmática. En la figura 9 se aprecia las células CHO expresando GFP, la cual por ser proteína soluble se encuentra mayormente localizada en el interior de la célula, observándose además en rojo la sonda que tiene afinidad por la membrana.

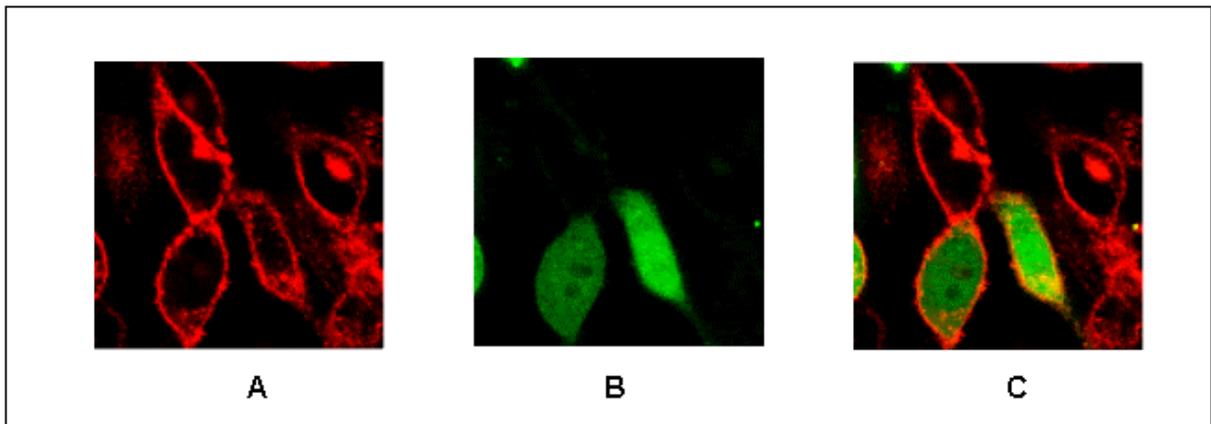


Figura 9: Localización de la proteína verde fluorescente en células CHO-K1: Células CHO-K1 fueron transfectadas pasajeramente, sembradas en cubreobjetos para su observación mediante microscopía confocal, A. Marcador de membrana plasmática, B. Células CHO-K1 tranfectadas con GFP y en C. Superposición de imágenes de la GFP y la sonda de membrana.

Obtenidos estos resultados se observó mediante microscopía confocal la proteína de fusión V2bGFP, la cual se expresaba establemente en células MDCK, incubándose con el marcador de membrana plasmática. En la figura 10 y 11 se puede observar la localización de la quimera V2bGFP utilizando microscopía confocal.

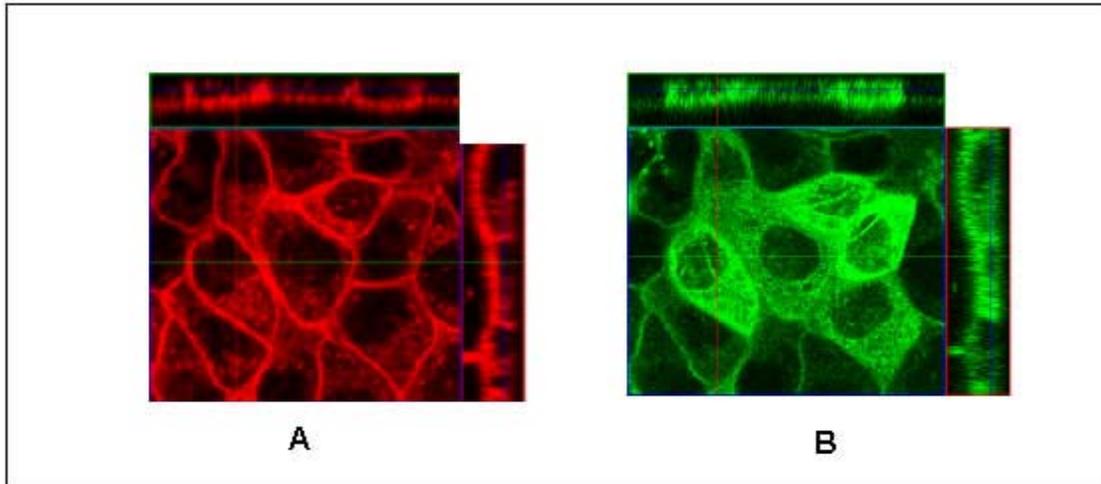


Figura 10: Localización de la isoforma V2bGFP en células MDCK mediante microscopía confocal: En A se aprecian células MDCK V2bGFP teñidas con el marcador de membrana Di-8 ANEPPS. En B se aprecia el mismo plano de células pero observándose solo la fluorescencia emitida por la proteína verde fluorescente unida al receptor. Las imágenes fueron obtenidas secuencialmente en cortes de 0.8 μm . Las imágenes se muestran en tres planos (x,y,z), observándose en la parte superior el corte transversal mientras que la imagen lateral corresponde al corte longitudinal de las células.

Para analizar la distribución subcelular de esta nueva isoforma de receptores de vasopresina, se utilizó la proteína de fusión V2b-GFP en conjunto con el marcador de membrana plasmática Di-8 ANEPPS. La secuencia de imágenes mostrada en la figuras 10 y 11 muestran una distribución en toda la superficie celular citoplasmática alcanzando la membrana plasmática (amarillo, plano xy). Más aún, el plano Z permitió discriminar entre subdominios apical y basolateral, encontrándose a la nueva isoforma V2b igualmente distribuida en ambos compartimientos.

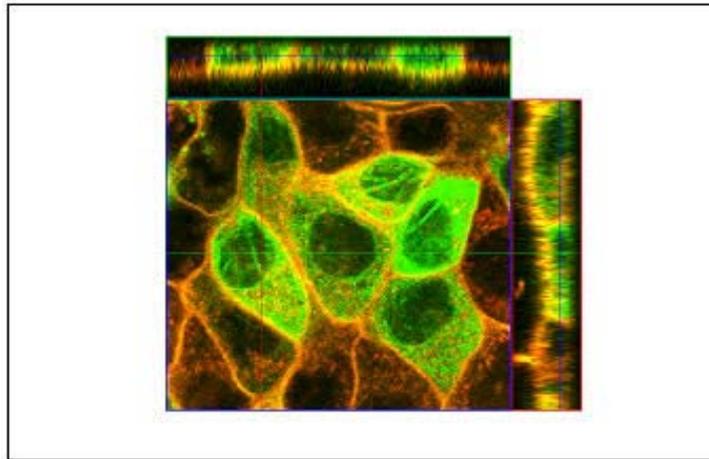


Figura 11: Colocalización de la isoforma V2bGFP en células MDCK mediante microscopía laser confocal. Células expresando establemente el cDNA de la isoforma V2b de receptores de vasopresina unida a GFP fueron monitoriadas por microscopía confocal. El plano xy muestra la colocalización en membrana plasmática de la quimera V2bGFP con el marcador Di-8 ANEPPS (Amarillo). En el plano Z se puede apreciar la localización atribuida tanto a membrana apical como basolateral.

Igualmente se hicieron estudios en un tipo celular distinto al renal, escogiéndose la línea celular no polarizada CHO-K1. Todo esto con el objetivo de observar el comportamiento de la nueva isoforma en un tipo celular que no contenga receptores de vasopresina. Se transfectaron pasajeramente el receptor V1a y la nueva isoforma de receptores de vasopresina V2b unida a la proteína verde fluorescente (métodos 3.2.3.3). Los clones V1a-GPF y V2b-GFP fueron observados mediante microscopía laser confocal según se aprecia en las figuras 12 y 13.

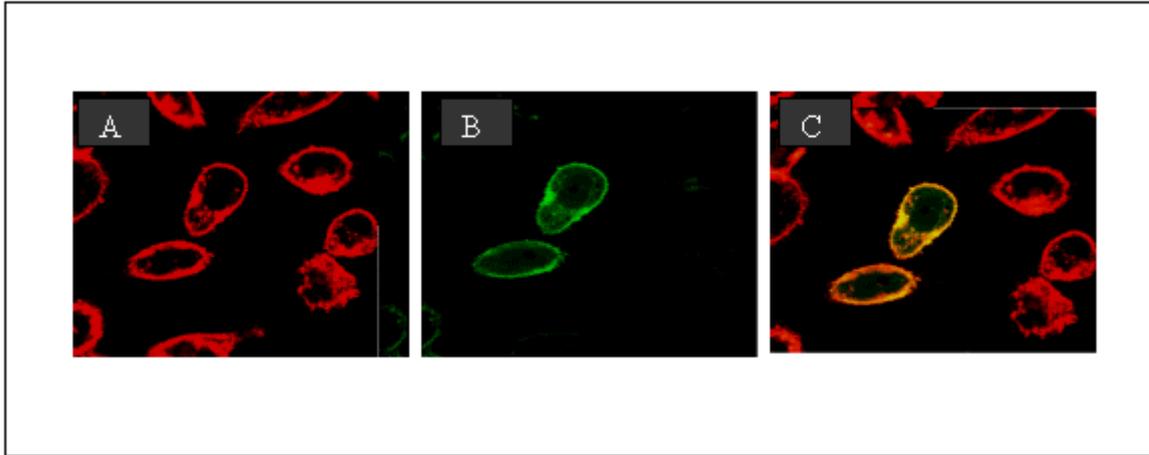


Figura 12: Colocalización del receptor V1aGFP en células CHO-K1 mediante microscopía laser confocal: Células CHO-K1 expresando pasajeramente el receptor V1a unido a GFP fue incubado con el marcador específico de membrana Di-8-Anepps. En A células incubadas con sonda Di-8 ANEPPS , En B se observa la imagen de células transfectadas con la quimera V1aGFP y en C se aprecia la colocalización de ambas en color amarillo.

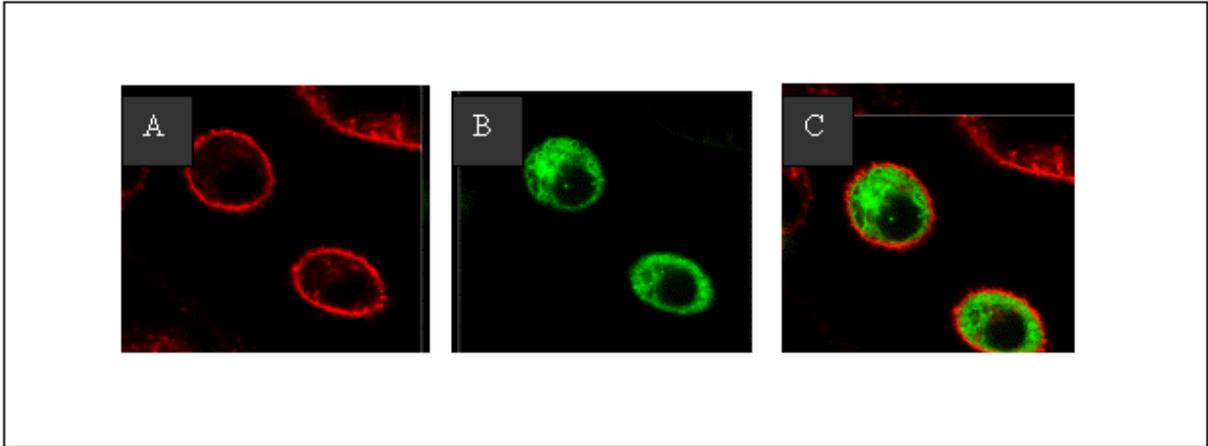


Figura 13: Colocalización del receptor V2bGFP en células CHO-K1 mediante microscopía laser confocal: células CHO-K1 expresando pasajeramente el receptor V2b unido a GFP fue incubado con el marcador específico de membrana Di-8- Anepps como se muestra en A. En B se observa la imagen de células transfectadas con la quimera V2bGFP y en C se aprecia la colocalización tanto del marcador como de la isoforma V2b.

Los estudios mediante microscopia confocal de células no polarizadas CHO-K1 tranfectadas con el receptor V1a y la colocación con la sonda específica de membrana plasmática permitieron confirmar la localización del receptor V1aGFP fundamentalmente a nivel de membrana plasmática. Sin embargo, al examinar la distribución de la isoforma V2b en este tipo celular, ésta se encuentra localizada al interior de la célula en el citoplasma celular, no logrando colocarse con el marcador de membrana. Cabe destacar que la línea celular CHO-K1 no expresa endógenamente receptores de vasopresina a diferencia de las células MDCK que sí expresan el receptor V2 de vasopresina.

4.5 Movilización de calcio

Se realizaron ensayos de movilización de calcio en células A-10, MDCK y células transfectadas establemente con las construcciones V1aGFP y V2bGFP, según lo descrito en métodos 3.2.3.4.

Primero se realizó un ensayo control en células A-10 a fin de comprobar que la medida ratiométrica utilizada para medir calcio fuera confiable. Las células A-10 expresan endógenamente el receptor V1a de vasopresina y además, según la literatura aumentan calcio, lo que fue corroborado al hacer la medición como lo muestra la Fig. 14.

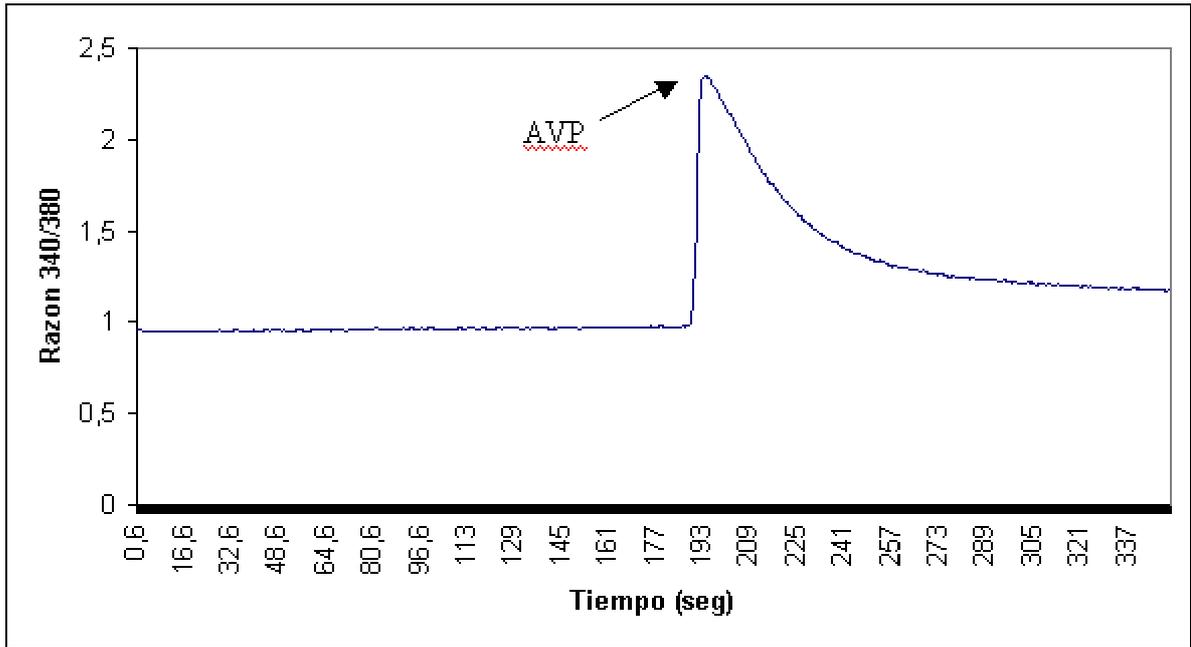


Figura 14: Movilización de calcio en células A-10 estimuladas con AVP: Células A-10 fueron incubadas en tampón fisiológico conteniendo Fura 2 y luego estimuladas con AVP 100 nM.

En la Fig. 14 puede apreciarse que AVP fue capaz de aumentar el calcio intracelular en células A-10.

A continuación en la Fig. 15 se observa el resultado de células MDCK sin transfectar estimuladas con AVP 100 μ M.

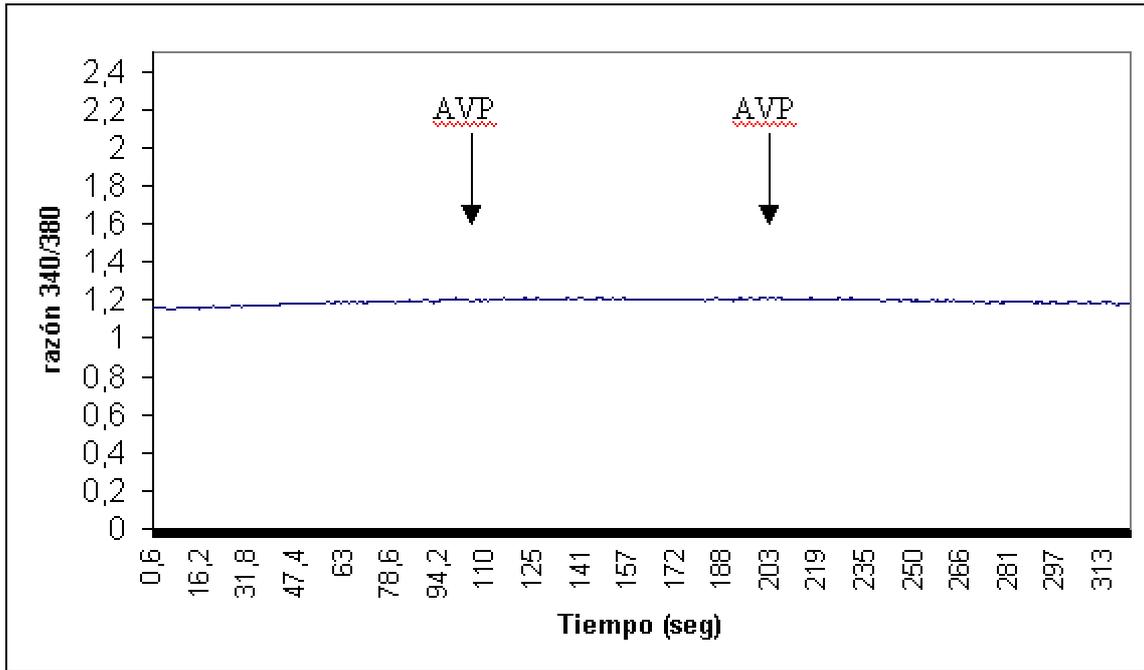


Figura 15: Movilización de calcio en células MDCK estimuladas con AVP: Células MDCK fueron incubadas en tampón fisiológico conteniendo Fura 2 y luego estimuladas con AVP 100 nM.

En la figura 15 se puede observar que las células MDCK nativas no movilizan calcio al ser estimuladas en repetidas ocasiones con vasopresina.

El resultado de la movilización de calcio en células MDCK frente al estímulo con ATP 100 μ M se muestra en la figura 16.

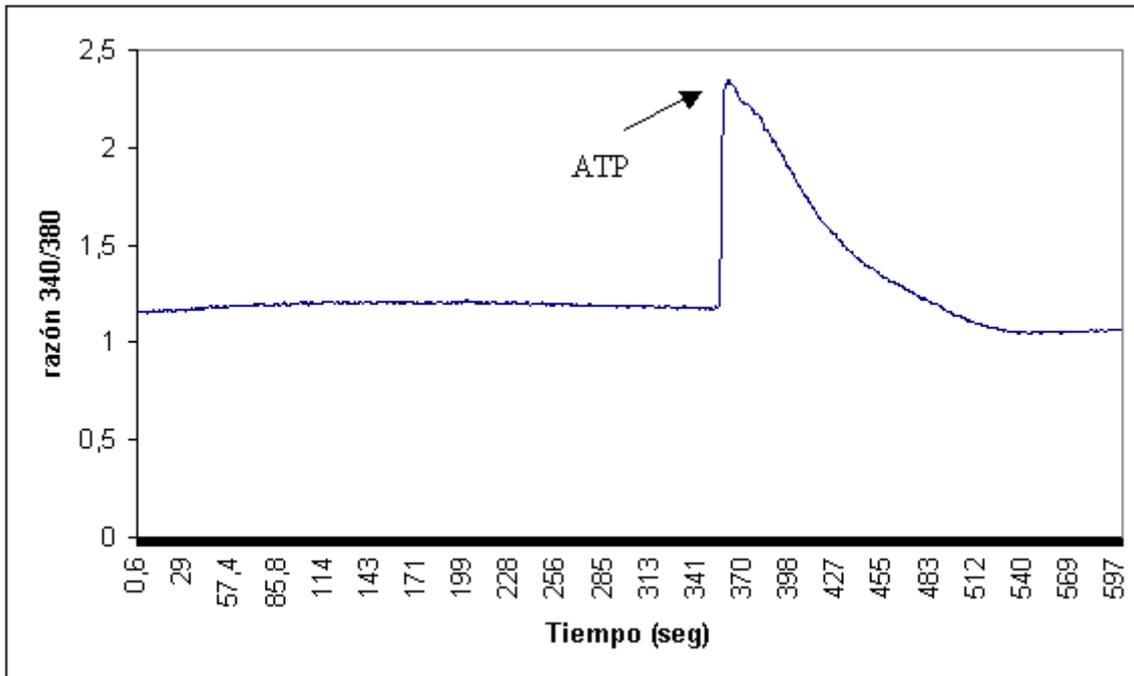


Figura 16: Movilización de calcio en células MDCK estimuladas con ATP: Células MDCK fueron incubadas en tampón fisiológico conteniendo Fura 2 y luego estimuladas con ATP 100 μ M.

En la figura 16 se puede observar que ATP fue capaz de elevar las concentraciones de calcio intracelular, pues las células MDCK poseen receptores purinérgicos expresados endógenamente.

Se midió movilización de calcio intracelular en células MDCK transfectadas establemente con la quimera V1a-GFP con el fin de utilizarla como control específico de aumento de calcio en receptores de vasopresina, observándose el resultado en la Fig. 17.

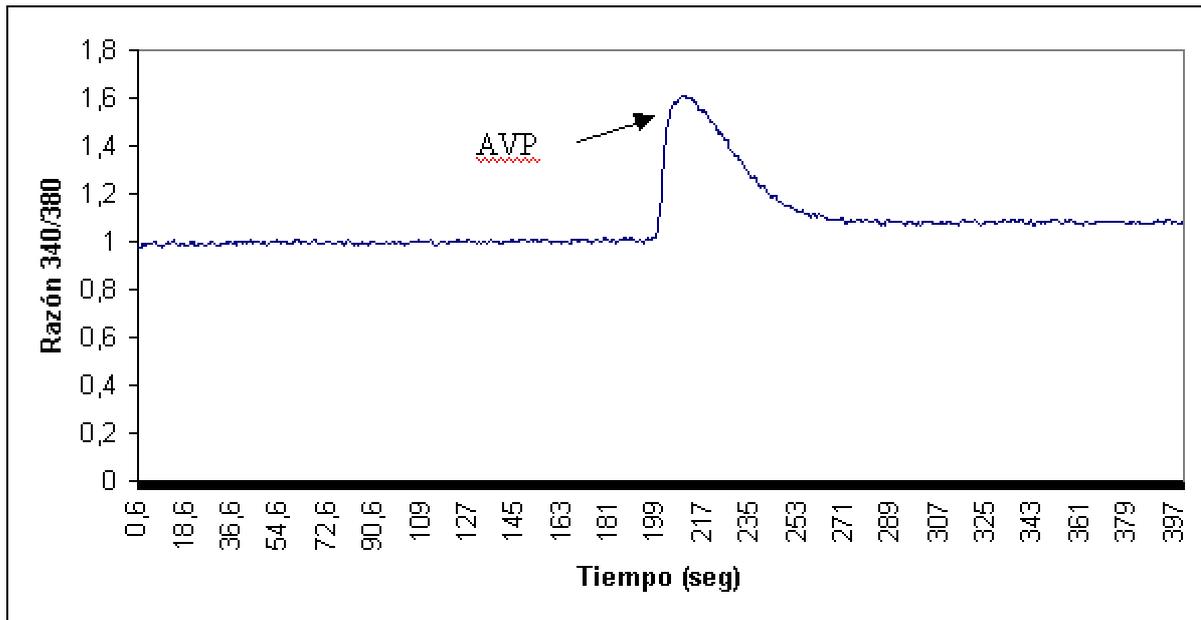


Figura 17: Movilización de calcio en células MDCK V1aGFP estimuladas con AVP: Células MDCK V1aGFP fueron incubadas en tampón fisiológico conteniendo Fura 2 y luego estimuladas con AVP 100 nM.

En la Fig. 17 se observa que la quimera V1a-GFP es capaz de aumentar el calcio intracelular lo que corrobora experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio (Campos et al., 2001).

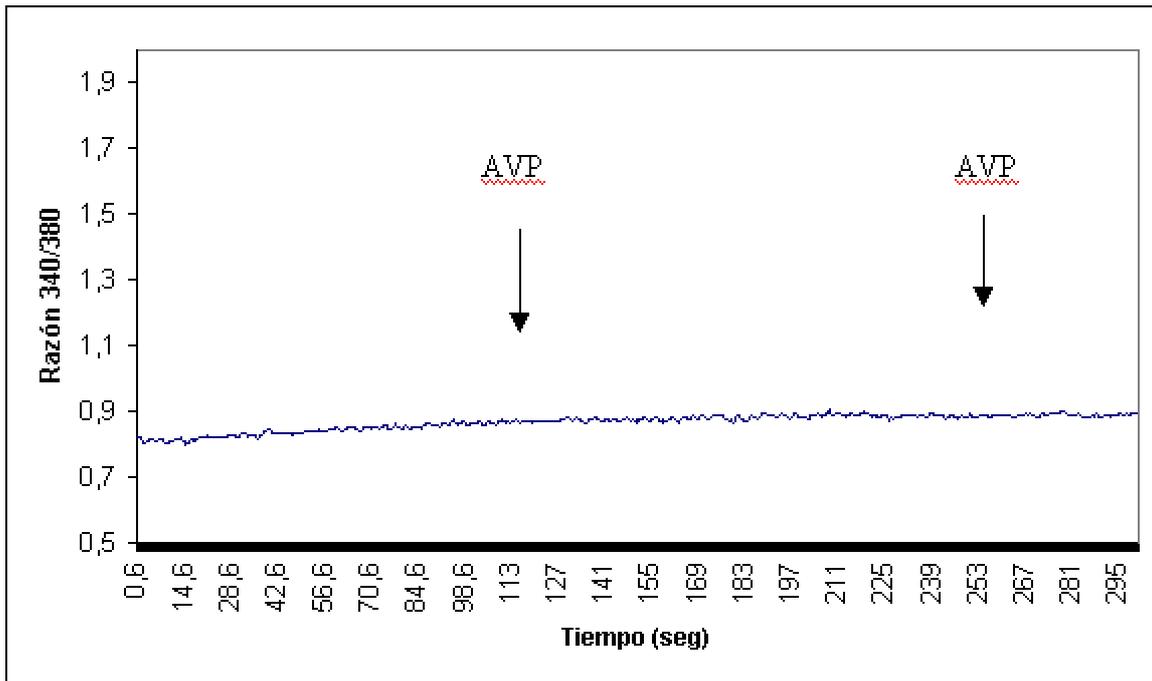


Figura 18: Movilización de calcio en células MDCK V2bGFP estimuladas con AVP: Células MDCK V2bGFP fueron incubadas en tampón fisiológico conteniendo Fura 2 y luego estimuladas con AVP 100 nM.

La figura 18 muestra que la isoforma V2b-GFP de receptores vasopresina no moviliza calcio intracelular al ser estimulada en repetidas ocasiones con vasopresina 100 nM. Sin embargo en la figura 19 se aprecia que al estimular con ATP 100 μ M se observa un aumento del calcio en células MDCK V2bGFP.

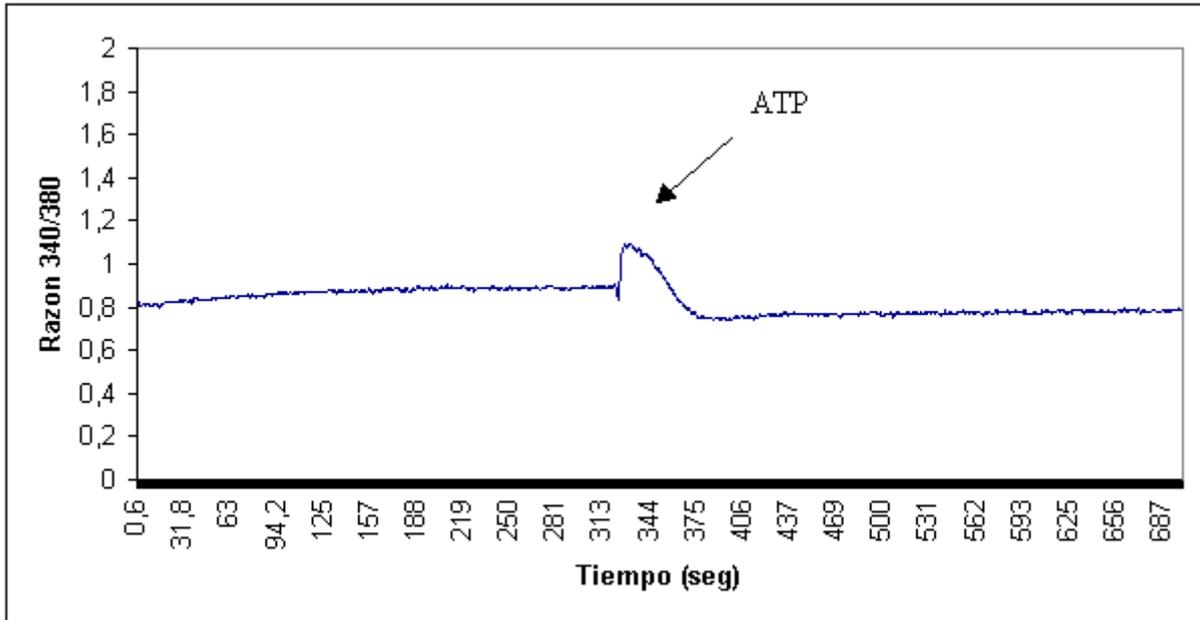


Figura 19: Movilización de calcio en células MDCK V2b-GFP estimuladas con ATP: Células MDCK V2b-GFP fueron incubadas en tampón fisiológico conteniendo Fura 2 y luego estimuladas con ATP 100 μ M.

5. DISCUSIÓN

Los efectos biológicos de la hormona arginina vasopresina son llevados a cabo por tres subtipos de receptores: V1a y V1b que activan fosfolipasas vía proteína $G_{q/11}$ y el receptor V2 que activa adenilato ciclasa (AC) vía proteína G_s (Birnbaumer, 2000). El receptor V1a en su mayoría es expresado en hígado, cerebro y células del músculo liso vascular, mientras que el receptor V1b o V3 se expresa mayoritariamente en la pituitaria anterior. El receptor V1a y V2 presentan una estructura primaria con aproximadamente un 45% de homología en la secuencia aminoacídica y pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios de transmembrana.

Las células epiteliales del riñón son el sitio más abundante de expresión de receptores V2. Estudios funcionales de activación de AC y ensayos de unión a vasopresina han identificado al subtipo V2 principalmente en el asa gruesa de Henle y túbulo colector (Morel et al., 1987). Sin embargo estas dos porciones del nefrón difieren en sensibilidad a vasopresina circulante (Imbert-Teboul et al., 1978), observándose en el túbulo colector un aumento del Ca^{2+} intracelular, vía receptor V2 (Champigneulle et al., 1993). Estos datos sugieren la posible existencia de dos subtipos distintos de receptores V2, o bien la posibilidad de una versatilidad de acoplamiento a proteínas G del mismo receptor en distintas porciones del nefrón. Por otro lado, se sabe, que la región codificante del gen del receptor V2 es separada por 2 intrones (Pan et al., 1992), lo que podría originar una diversidad de receptores de vasopresina por empalmes alternativos del RNA mensajero. En 1994 Firsov y colaboradores (Firsov et al., 1994) demostraron la existencia de un RNA mensajero

de la porción distal del nefrón distinto al descrito para el receptor V2 originado por una variante de empalme al tercer exón, al cual denominaron V2s.

De acuerdo a los datos anteriormente mencionados, se optó por caracterizar esta nueva isoforma de receptores de vasopresina, clonándola desde riñón de rata por RT-PCR. Mediante este procedimiento se obtuvieron dos productos de amplificación correspondientes a dos formas de empalmes distintos del transcrito primario. La forma predominante correspondió a un fragmento de 1225 pb que codifica para una proteína de 371 aa, la que fue identificada como el cDNA del receptor V2 de rata descrito por Lolait en 1992 (Lolait et al., 1992). Además, fue identificado un fragmento de aproximadamente 1100 pb, el cual fue denominado isoforma V2b. El análisis de la secuencia del gen del receptor V2 reveló que la región codificante es interrumpida por dos intrones pequeños; el intrón 1 comienza 25 pb río abajo del ATG. Esto quiere decir, que posee una secuencia de aproximadamente 357 nucleótidos con un sitio consenso aceptor y uno donador de empalme. El intrón 2 comienza en cambio, en el nucleótido 910, teniendo un sitio donador y dos sitios aceptores de empalme, siendo estos últimos, los responsables de las isoformas detectadas por RT-PCR para receptores de vasopresina.

Producto del empalme alternativo al tercer exón, en la isoforma V2b se produce una delección de 76 pb en el cDNA, lo que provoca un cambio en el marco de lectura originando una proteína de 31 aa más corta que la forma normal. Este cambio compromete a la tercera asa extracelular, al dominio de transmembrana siete y a la parte carboxiterminal. Basados en análisis de hidrofobicidad, Firsov y colaboradores en 1994 postulan que en este segmento generaría un nuevo dominio

de transmembrana. Por lo tanto, serían necesarios nuevos experimentos para determinar si el carboxilo terminal de esta isoforma es intra o extracelular.

A fin de estudiar la localización intracelular de esta isoforma del receptor de vasopresina se clonó el V2b en el plasmidio pEGFPN1 de tal forma que la GFP quedó al lado carboxilo terminal del receptor y en el mismo marco de lectura que éste y al eliminar el condón de término del receptor el producto de este gen fue una proteína de fusión entre el receptor y la GFP.

Una vez obtenido el constructo V2b-GFP, se secuenció tanto el cDNA del receptor V2b como la GFP, encontrándose una mutación del cDNA del V2b correspondiente al nucleótido 115, el cual origina un cambio aminoacídico en la posición 39 substituyendo el aminoácido alanina por prolina. Esta mutación está ubicada 2 aa antes del comienzo del primer dominio de transmembrana sitio que, probablemente, no estaría involucrado ni en la llegada a membrana ni en la funcionalidad del receptor. Esta mutación fue introducida al subclonar por PCR el receptor en el plasmidio pEGFPN1, puesto que el cDNA del V2b original no posee esta mutación. Este paso fue necesario a fin de eliminar el codón de término del receptor y colocar en el mismo marco de lectura al receptor y la GFP. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica *in vitro* que imita la habilidad natural de la célula de duplicar el DNA (Stryer, 1995). El mayor problema en el PCR es la fidelidad de copia de la enzima Taq polimerasa. Existen distintos tipos de polimerasas que de acuerdo a la fidelidad de la replicación se clasifican en más o menos confiables para efectuar la reacción de PCR. De acuerdo a esto la mutación habría sido provocada por el uso de un tipo de Taq polimerasa que no poseía actividad para corregir los errores en la inserción de nucleótidos.

Ahora bien, teniendo en cuenta la importancia que juega el segmento carboxilo terminal en el correcto procesamiento e inserción del receptor en la membrana plasmática (Schülein et al., 1996), se investigó si la nueva isoforma V2b era capaz de comportarse funcionalmente de manera parecida a los demás receptores.

La GFP ha sido ampliamente utilizada para observar expresión génica, tráfico de proteínas y localización de receptores (Kain et al., 1995; Tavaré et al., 2001) incluyendo estudios de distribución subcelular de receptores de vasopresina (Schülein et al., 1998; Campos et al., 2001). Estos estudios han demostrado que la expresión de los receptores como proteína de fusión a la GFP no cambia las propiedades funcionales ni farmacológicas de los receptores

Con el objeto de estudiar la localización intracelular de la isoforma V2b, se escogió la línea celular MDCK, la cual está bien caracterizada para estudiar polaridad celular (Yeaman et al., 1999). Estas células cumplen varios requisitos, entre los cuales el más destacable, es la capacidad de poder diferenciarse en subdominios, originando una estructura polarizada. Además, en estas células se han realizado numerosos estudios de tráfico intracelular de receptores acoplados a proteína G (Schülein et al., 1998; Campos et al., 2001; Hermosilla y Schülein 2001). Se realizaron transfecciones estables en células MDCK de la fusión de fusión V2b-GFP, además como control fueron utilizadas células que expresaban establemente el receptor V1a unido a GFP (Campos et al., 2001) y GFP en el mismo tipo celular. Se escogió al receptor V1a de vasopresina como control, pues alcanza la membrana plasmática con facilidad, posee funcionalidad y además es un receptor modelo en la familia de receptores acoplados a proteína G (Thibonnier, 2000).

Los estudios de microscopia confocal de la proteína de fusión V2b-GFP se realizaron en células cultivadas a 100 % de confluencia, puesto que es requisito fundamental que sean cultivadas por un periodo largo de tiempo para alcanzar la diferenciación de los compartimientos apical y basolateral. Se utilizaron como proteínas control la quimera V1a-GFP. Se observó que este receptor estaba localizado principalmente en la membrana plasmática confinado al compartimiento basolateral, no observándose en el dominio apical. Estos resultados son coincidentes con aquellos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio sobre el comportamiento de este receptor (González et al., 1997; Campos et al., 2001). Por otra parte, microscopía confocal de células MDCK expresando solamente a la GFP, mostró que esta proteína se encuentra ubicada en el citoplasma y núcleo celular. Cuando se estudió mediante microscopía confocal la localización de la proteína de fusión V2b-GFP, ésta se localizó en membrana plasmática, pero también se apreció marca en el citoplasma celular. Posteriormente, a fin de determinar si efectivamente el receptor V2b unido a la proteína verde fluorescente se encuentra en la membrana celular se utilizó un marcador de membrana plasmática. Se escogió por tanto una sonda lipofílica del tipo potenciométrica fluorescente denominada Di - 8 Anepps que se intercala en la membrana plasmática. Este marcador emite a dos longitudes de onda de emisión, 465nm y 635 nm, observándose emisión roja al ser excitada. Por lo tanto, al hacer la superposición de ambas imágenes, es decir, aquella dada por el receptor V2b unido a GFP y aquella dada por la sonda de membrana debería observarse de color amarillo. Como control se expresó de forma pasajera a la proteína verde fluorescente en células CHO-K1, que por ser proteína soluble no

debería aparecer en membrana, sino quedar retenida en el citoplasma celular y por lo tanto, no debería haber colocalización de ambos. Los resultados apoyaron la idea que el marcador de membrana plasmática era específico pues la GPF no logró colocalizar con la sonda.

Observaciones por microscopía confocal revelaron que el receptor V2b se localizó en toda la superficie celular, es decir tanto en el dominio basolateral como en el compartimiento apical. La superposición de imágenes obtenidas del receptor V2b y aquellas generadas con la sonda de membrana muestran claramente que el receptor V2b alcanza la membrana celular. Estos resultados son diferentes a lo observado respecto a distribución subcelular de receptores de vasopresina, pues el receptor V1a se ubica principalmente en el dominio basolateral al igual que el receptor V2, encontrándose cantidades casi indetectables en el subdominio apical (Schülein et al., 1998; Andersen- Beckh et al., 1999; Campos et al., 2001).

La expresión apical generalmente es menos común en receptores acoplados a proteínas G observándose sólo en receptores A1 de adenosina (Saunders, et al., 1996) y en el receptor de rodopsina (Chuang y Sung, 1998). La expresión basolateral ha sido demostrada, en cambio, para el receptor adrenérgico α_{2A} (Keefer y Limbird, 1993), α_{2B} y α_{2C} (Wozniok y Limbird, 1996), en receptores de TSH, FSH y LH (Beau et al., 1997), receptores purinérgicos $P_{2Y_{11}}$ (Zambon et al., 2001), receptor de glutamato metabotrópico R7 (mGluR7) (McCarthy et. al., 2000) y los receptores de vasopresina V1a y V2 (Campos et al., 2001; Schülein et al., 1998).

Estudios sobre las bases moleculares involucradas en la polarización de GPCRs, indican que la dirección de las proteínas a distintos subdominios estaría relacionada

con secuencias de señal localizadas en regiones de la proteína ya sean contiguas o no (Saunders et al., 1998).

Se ha determinado que las señales citoplasmáticas basolaterales son dominantes frente a aquellas apicales exoplasmáticas. De hecho, formas truncadas de receptores de membrana basolateral, como por ejemplo el receptor de LDL y Fc, que han perdido sus señales citosólicas, son destinadas a menudo a membrana apical, reflejando la existencia de señales apicales recesivas (Mostov et al., 1986; Prill et al., 1993). Recientemente, sin embargo, se han determinado ciertas excepciones a la regla de las señales basolaterales dominantes, como es el dominio corto citoplasmático de la proteína apical hemoaglutinina (Jacob et al., 1999).

Estudios anteriores mostraron que el receptor V2 de vasopresina era expresado predominantemente en membrana basolateral (Schülein et al., 1998; Andersen-Beckh et al., 1999), siendo el dominio intracelular número 2 el que contenía las señales que promueven expresión en esta superficie, la cual era señal dominante frente a la porción carboxilo terminal que contiene la señales de dirección apical (Hermosilla y Schülein 2001).

En el presente estudio se observó la localización del receptor V2b tanto en el dominio apical como basolateral. Esto podría tener al menos dos explicaciones posibles, la primera que el receptor pierda su expresión polarizada al cambiar su parte carboxiterminal y entonces ser destinado tanto al dominio apical como basolateral, y la segunda, que el receptor sea destinado a la membrana apical y aquel que se encuentra en el dominio basolateral sea producto del rescate por

oligomerización con el receptor V2a nativo. La posibilidad que el receptor V2b sea destinado a la membrana apical se sustenta en el hecho que este receptor conserva los dos sitios de N-glicosilación, los cuales se ha visto que son señales de destinación apical y por otro, pierde dos potentes dominios de destinación basolateral, como son los motivos NPXY y un motivo dileucina al cambiar la parte carboxiterminal producto del empalme alternativo. La oligomerización de receptores es un fenómeno cada día más aceptado y explicaría el rescate funcional de formas mutadas o truncadas de receptores, lo que ha sido ampliamente demostrado en los receptores V2 de vasopresina (Zhu and Wess, 1998; Birnbaumer, 2000). Este mecanismo podría estar ocurriendo en este sistema puesto que las células MDCK expresan endógenamente receptores V2a de vasopresina y eso podría explicar la localización basolateral de parte del receptor V2b.

Ahora bien, con el objetivo de establecer si esta nueva variante de empalme cumple algún rol funcional, se realizaron ensayos de movilización de calcio intracelular en células MDCK transfectadas con V2b-GFP y se usaron como control células A-10 que expresan receptores V1a y células MDCK transfectadas con el V1a-GFP. Se determinó el aumento de calcio intracelular en células MDCK que expresan establemente la proteína de fusión V2b-GFP y a concentraciones de 100 nM no fue posible observar una respuesta, sin embargo las células respondieron correctamente a ATP, indicando que los sistemas de transducción de señales estaban intactos. En cambio células que expresaban establemente la proteína de fusión V1a-GFP o expresaban endógenamente el receptor V1a como las células A-10 respondieron a las mismas dosis de AVP. Estos resultados claramente muestran

que esta nueva isoforma al menos no estaría acoplada al sistema PLC-IP3-aumento de calcio intracelular.

La transducción de señales es un mecanismo complejo que necesita de la interacción de un conjunto de proteínas que amplifiquen una señal a través de la célula (Alberts, 1995). El resultado negativo respecto a la movilización de calcio en la quimera V2b-GFP puede deberse a varios motivos. Primero, puede ser que el mecanismo de transducción de señales para este receptor sea por interacción a adenilato ciclasa al igual que el receptor V2 de vasopresina, o bien que la GFP fusionada al extremo carboxilo terminal pueda ocasionar un plegamiento anormal del receptor que no permita la interacción con las otras proteínas de la cascada, sin embargo, este no es el caso para el receptor V1a unido a la GFP que responde adecuadamente. También puede que el tipo celular utilizado contenga en menor cantidad ciertos elementos implicados en la transducción de señales o bien que simplemente esta isoforma no señalice por si sola, sino que necesite de la interacción con otros receptores formando heteroligómeros, como ya ha sido descrito para una gran cantidad de receptores acoplados a proteína G, entre ellos el receptor GABA_b (White *et al.* 1998) .

Las células MDCK poseen receptores del tipo V2 de vasopresina, como se mencionó anteriormente, por esta razón se estudió en un tipo celular totalmente distinto que no expresara receptores de vasopresina, como la línea celular derivada de ovario de hámster chino CHO-K1. Se hicieron transfecciones pasajeras de las proteínas de fusión V1a-GFP y V2b-GFP observándose la localización mediante microscopía confocal con el marcador de membrana Di-8 Anepps. Los resultados

fueron concluyentes, el receptor V1a se localizó principalmente en membrana plasmática mientras que la isoforma V2b no logró colocalizar con la sonda marcadora de membrana, quedándose en el interior del citoplasma celular. Esto puede ser porque el receptor V2b en esta línea celular no alcance la membrana plasmática o porque el receptor es procesado más lentamente que el V1a. Oksche y colaboradores en el 2000 han demostrado que el receptor V1a humano alcanza rápidamente la superficie celular cuando es expresado en forma pasajera mientras que el receptor V2 de ratón es procesado mas lentamente y gran parte del receptor permanece en el citoplasma después de 24 horas de transfección. Estos mismos antecedentes mostraron que el reemplazo de una lisina cargada positivamente por un ácido aspártico en la posición 100 del V2a humano causa una dramática reducción de la cantidad de receptor que alcanza la superficie celular acompañado por una retención en el retículo endoplásmico. Al contrario, un reemplazo del ácido aspártico en posición 100 por una lisina en el receptor V2a de ratón aumentó la expresión en la superficie celular y disminuyó notablemente la retención en el retículo endoplásmico. Dada la similitud en la secuencia entre el receptor V2 de ratón y de rata, incluyendo el residuo de ácido aspártico en posición 100, podría ser posible que el receptor V2b de rata al ser expresado en forma pasajera, es procesado más lentamente al igual que el receptor de ratón y por lo tanto, solo una pequeña proporción llegue a la superficie. En cambio, en células que expresan establemente el receptor la cantidad de receptor que llega a la superficie es mayor y detectada fácilmente en la microscopía confocal. Posteriores experimentos serán necesarios para substantiar este punto.

Considerando los resultados obtenidos en esta tesis sería importante investigar si esta nueva isoforma es funcional, es decir si une el ligando y cual sería el mecanismo de transducción de señal implicado en la conducción del mensaje del V2b. Además, sería muy interesante el estudio de rescate funcional de esta isoforma con el segmento carboxiterminal del receptor V2. Estos nuevos experimentos podrían aportar valiosa información acerca de la real importancia de esta isoforma del receptor V2 de vasopresina en la fisiología tubular renal.

6. BIBLIOGRAFIA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K. and Watson, J. (1996) *Biología molecular de la célula*, 3º Edición. Omega.

Andersen-Beckh B., Dehe, M., Schülein, R., Wiesner, B., Rutz, C., Liebenhoff, U., Rosenthal, W. and Oksche, A. (1999) Polarized expression of the vasopressin V2 receptor in Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney Int.* 56, 517-527.

Antonni, F. A. (1988) *Ann. NY Acad. Sci.* 512, 195-204.

Barberis, C., Mouillac, B., Durroux, T. (1998) Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol.* 156, 223-229.

Beau, I., Misrahi, M., Gross, B., Vannier, B., Loosfelt, H., Vu Hai, M., Pichon, C. and Milgrom, E. (1997) Basolateral localization and transcytosis of gonadotropin and thyrotropin receptors expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 272, 5241-5248.

Beau, I., Groyer-Picard, M., Le Bivic, A., Vannier, B., Loosfelt, H., Milgrom, E. and Misrahi, M. (1998) The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 18610-18616.

Berrada, K., Plesnicher, C., Luo, X. and Thibonnier, M. (2000) Dynamic interaction of human vasopressin/oxytocin receptor subtypes with G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C after agonista stimulation. *J. Biol. Chem.* 35, 27229-27237.

Birnbaumer, M., Seibold, A., Gibert, S., Ishido, M., Barberis, C., Antaramian, A., Brabet, P. and Rosenthal, W. (1992) Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* 357, 333-335.

Birnbaumer, M. (2000) Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 406-410.

Campos, D., Reyes, C., Sarmiento, J., Navarro, J. and González (2001) Polarized expresión of the GFP- Tagged rat V1a vasopressin receptor. *Bioch. and Bioph. Res. Com.* 289, 325-328.

Champigneulle, A., Siga, E., Vassent, G. and Imbert-Teboul, M. (1993) V2- like vasopressin receptors mobilizes intracellular Ca^{2+} in rat medullary collecting tubules. *Am. J. Physiol.* 265, 35-45.

Chuang, J. and Sung, C. (1998) The cytoplasmic tail of rodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 142, 1242-1256.

Cotte, N., Balestre, MN., Phalipou S., Hirbert M., Manning, M., Barberis C. and Mouillac B. (1998) Identification of residues responsible for the selective binding of peptide antagonists and agonists in the V2 vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* 45, 29462-29468.

Du Vigneaud, V. (1954) Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. Harvey Lectures Ser. 50, 1-26.

Edwards, S.E. and Limbird, L.E. (1999) Role for the third intracellular loop in de cell surface stabilization of the α_{2A} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 16331-16336.

Erlenbach, I. and Wess, J. (1998) Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity. *J. Biol. Chem.* 273, 26549-26558.

Firsov, D., Mandon, B., Morel., Merot, J., Le Maout, S., Bellanger, A., Rouffignac, C., Elalouf, J. and Buhler, JM. (1994) Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nefron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor. *Eur. J. Physiol.* 429, 79-89.

Gonzalez, C., Figueroa, C., Reyes, C., Caorsi, C., Troncoso, S. and Menzel, D. (1997) Immunolocalization of V1 vasopressin receptors in the rat kidney using anti-receptor antibodies. *Kidney Int.* 52, 1206-1215.

Hermosilla, R. and Schülein, R. (2001) Sorting functions of the individual cytoplasmic domains of the G protein-coupled vasopressin V2 receptor in Madin Darby canine Kidney epithelial cells. *Mol. Pharm.* 60, 1031-1039.

Howl, J., Ismail, T., Strain, A., Kirk, C., Anderson, D. and Wheatley, M. (1991) Characterization of human liver vasopressin receptor. *Biochem. J.* 276, 189-195.

Hunziker, W. and Fumey, C. (1994) A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J.* 13, 2963-2967.

Imbert-Teboul, M., Chabardes, D., Montegut, M. and Morel, F. (1978) Vasopressin-dependent AC activities in the rat kidney medulla: evidence for two separate sites of action. *Endocrinology* 102, 1254-1261.

Innamorati, G. (1996) A fully active non- glycosylated V2 vasopressin receptor. *Mol. Pharm.* 50, 467-473.

Innamorati, G., Sadeghi, H., Tran, N. and Birnbaumer, M. (1997) A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 2222-2226.

Jacob, R., Preuss, U., Panzer, P., Alfalah., M., Quak, S., Roth, M., Naim, H. and Naim, H. Y. (1999) Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hidrolase and influenza virus hamagglutinin. *J. Biol. Chem.* 274, 8061-8067.

Jard, S. (1998) Vasopressin receptors. A historical survey. *Adv. Exp. Med. Biol.* 449, 1-13.

Kain, S., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T., Ward, W. and Kitts, P. (1995) Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques* 19, 650-655.

Keefer, JR. and Limbird LE. (1993) The alpha 2A-adrenergic receptor is targeted directly to the basolateral membrane domain of Madin-Darby canine kidney cells independent of coupling to pertussis toxin- sensitive GTP- binding proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 11340-11347.

Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. and Okayama, H. (1992) Structure and expression of a human oxytosine receptor. *Nature* 30, 8611-8616.

Klussmann, E., Maric, K. and Rosenthal, W (2000) The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. *Res. Physiol. Biochem. Pharm.* 141, 33-95.

Knoers, N.V.M. (1994) Molecular characterization of nephrogenic diabetes insipidus. *Trends Endocrinol. Metab.* 7, 422-428.

Kojro, E. and Fahrenholz, F. (1995) Ligand-induced cleavage of the V2 vasopressin receptor by a plasma membrane metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 270, 6476-6481.

Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Bender, F., Krause, G. and Fahrenholz, F. (1999) Structural requirements for V2 vasopressin receptor proteolytic cleavage. *Eur. J. Biochem.* 266, 538-548.

Krause G., Hermosilla, R., Oksche, A., Rutz, C., Rosenthal, W. and Schülein, R. (2000) Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the c-terminal tail of the vasopressin V2 receptor. *Mol. Pharmacol.* 57, 232-242.

Lefkowitz, RJ. G Protein-coupled Receptors. III. New Roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 18677-18680.

Liu, J., and Wess, J. (1996) Different single receptor domains determine the distinct G protein coupling profiles of members of the vasopressin receptor family. *J. Biol. Chem.* 273, 26549-26558.

Lolait, S., O Carroll, A., McBride, O., Konig, M., Morel, A. and Brownstein, M. (1992) Cloning and characterization of vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 357, 336-339.

Matter, K., Hunziker, W. and Mellman, I. (1992) Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 27,741-753.

McCarthy, J., Lim, S., Elkind, B., Trimmer, J., Duvoisin, R., Rodriguez-Boulan, E. and Caplan, M. (2000) The C-terminal tail of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGluR7) is necessary but not sufficient for cell surface delivery and polarized targeting in neurons and epithelia. *J. Biol. Chem.* in press.

Morel, F., Imbert-Teboul, M. and Chabardes, D. (1987) Receptors to vasopressin on other hormones in the mammalian kidney. *Kidney Int.* 31, 512-520.

Morel, A., O Carroll, A., Brownstein, M and Lolait, S. (1992) Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature* 356, 523-526.

Mostov, K., De Bruyn Kops, A. and Deitcher, D. (1986) Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis. *Cell* 46, 613-621.

Mulder, SM., Bichet, DG., Rijss, JP., Kamsteeg, EJ., Arthus, MF., Lonergan, M. and Deen, PM. (1998) An aquaporine-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex. *J. Clin. Invest.* 102, 57-66.

Murasawa, S., Matsubara, H., Kijima, X., Maruyama, K., Mori, Y. and Inada, M. (1995) Structure of rat V1a vasopressin receptor gene and characterization of its promoter region and complete cDNA sequence of the 3'- end. *J. Biol. Chem.* 270, 20042-20050.

Nelson, W. (1991) Cytoskeleton functions in membrane traffic in polarized epithelial cells. *Cell. Biol.* 2, 375-385.

Nonoguchi H., Owada A., Kobayashi N., Takayama M., Terada Y., Koike J., Ujiie K., Marumo F., Sakai T. and Tomita K. (1995) Immunohistochemical localization of V2 vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V2 receptor in terminal inner medullary collecting ducts. *J Clin Invest.* 96,1768-1778.

Oksche, A., Schulein, R., Rutz, C., Liebenhoff, U., Dickson., Muller, H., Birnbaumer, M. and Rosenthal, W. (1996) Vasopressin V2 receptors mutants that cause X- linked nephrogenic diabetes insipidus: analysis of expresion, processing and function. *Mol. Pharm.* 50, 820-838.

Oksche, A. and Rosenthal, W. (1998) The molecular bases of nephrogenic diabetes insipidus. *J. Mol. Med.* 76, 326-337.

Oksche, A., Dehe, M., Schulein, R., Wiesner, B. and Rosenthal, W. (1998) Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. *FEBS Lett.* 424, 57-62.

Oksche, A., Leder, G., Valet, S., Platzer, M., Hasse, K., Geist, S., Krause, G., Rosenthal, A. and Rosenthal, W. (2002) Variant amino acids in the extracelular

loops of murine and human vasopressin V2 receptors account for differences in the cell surface expression and ligand affinity. *Mol. Endocr.* 16, 799-813.

Pan, Y., Metzberg, A., Das, S., Jing, B. and Gitschier, J. (1992) Mutations in the V2 vasopressin receptor gene are associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Nature Gen* 2, 103-106.

Pickering, B. T., Swann, R. W. and González C. B. (1983) Biosynthesis and processing of neurohypophyseal hormones. En: de Wied D., Gispen W.H. (ed) *Neuropeptides and Behavior*: 1-18. Pergamon Press, Oxford.

Prill, V., Lehmann, L., von Figura, K. and Peter, C. (1993) The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signal for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *EMBO J.* 12, 2181-2193.

Rosenthal, W. (1993) Nephrogenic diabetes insipidus: a V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 268, 13030-13033.

Sadeghi, H. (1997) Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor. *Mol. Pharm.* 52, 21-29.

Sadeghi, H. and Birnbaumer M. (1999) O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology.* 9, 731-737.

Saunders, C., Keefer, J., Kennedy, A., Wells, J. and Limbird, L. (1996) Receptors coupled to pertussis toxin-sensitise G-proteins traffic to opposite surfaces in Madin-Darby canina kidney cells. *J. Biol. Chem.* 271, 995-1002.

Saunders, C., Keefer, J., Bonner, C. and Limbird, L (1998) Targeting of G protein couple receptors to the basolateral surface of polarized renal epithelial cells involves multiple, non- contiguous structural signals. *J. Biol. Chem.* 273, 24196-24206.

Schülein, R., Rutz C. and Rosenthal, W. (1996) Membrane targeting and determination of transmembrane topology of the human vasopressin V2 receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 28844-28852.

Schülein R., Liebenhoff, Muller, H., Birbaumer, M. and Rosenthal, W. (1996) Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *Biochem. J.* 313, 611-616.

Schülein, R., Lorenz, D., Oksche, A., Wiesner, B., Hermosilla, R., Ebert, J. and Rosenthal, W. (1998) Polarized cell surface expression of the green fluorescent protein-tagged vasopressin V2 receptor in Mardin Darby canine Kidney. *FEBS Letter.* 441, 170-176.

Schülein, R., Hermosilla, R., Oksche, Dehe, M., Wiesner, B., Krause, G. and Rosenthal, W. (1998) A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol. Pharm.* 54, 525-535.

Schmale, H., Bahnsen, U. and Richter D. (1993) Structure and expression of the vasopressin precursor gene in central diabetes insipidus. *Ann. NY Acad. Sci.* 689, 74-82.

Seibold A, Brabet P, Rosenthal W, Birnbaumer M. Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gene(1992) *Am. J. Hum Genet* . 51, 1078-1083.

Simon, K. and Fuller, S. (1985) Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 243-288.

Stryer, L. (1995) Bioquímica. 4^{ta} edición, Ed. Revertè.

Sugimoto, T., Saito, M., Mochizuki, S., Watanabe, Y., Hashimoto, S. and Kawashima, H. (1994) Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 3304-3310.

Tavaré, JM., Fletcher, LM. and Welsh, GI. (2001) Using green fluorescent protein to study intracellular signaling. *Journal of Endocrinology* 170, 297-306.

Thibonnier, M., Coles, P. and Shoman M. (2000) The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists. *Annu. Rev. Pharm. Tox.* 41, 175-202.

Thrasher, T., Keil L., Ramsay D. (1982) Hemodynamic, hormonal, and drinking responses to reduced venous return in the dog. *Am. J. Physiol.* 243, 352-362.

Ventura, A., René, P., Keyzer, Y., Bertagna, X. and Clauser, E. (1999) Gene and cDNA cloning and characterization of the mouse V3/V1b pituitary vasopressin receptor. *J. Mol. Endocrinology* 22, 251-260.

White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M. and Marshall, F. H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(b) receptor. *Nature* 396, 679-682.

Woznuak, M. and Limbird LE. (1996) Three α_2 -adrenergic receptor subtypes achieve basolateral localization in Madin – Darby canine kidney II cells via different targeting mechanisms. *J. Biol. Chem.* 271, 5017-5024.

Yang, CR., Senatorov, VV. and Renaud, L. (1994) Organum vasculosum lamina terminalis-evoked postsynaptic responses in rat supraoptic neurones in vitro. *Journal of Physiology* 477, 59-74.

Yeaman, C., Grindstaff, K. and Nelson, J. (1999) New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiological Reviews* 79, 73-98.

Zambon, A.C., Brunton, L.L., Barrett, K.E., Hughes, R.J., Torres, B. and Inselk, P.A. (2001) Cloning, expression, signalling mechanism and membrane targeting of P2Y₁₁ receptors in Madin Darby canine kidney cells. *Mol. Pharm.* 60, 26-35.

Zhu, X. and Wess, J. (1998) Truncated V₂ vasopressin receptors as negative regulators of Wild-Type V₂ receptor function. *Biochemistry* 37, 15773-15784.