

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

PROFESOR PATROCINANTE: **Dr. Carlos B. González F.** Instituto de Fisiología Facultad de Medicina

DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE OLIGÓMEROS DEL RECEPTOR V2 DE VASOPRESINA

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

CÉSAR ANDRÉS TRIGO HIDALGO

VALDIVIA – CHILE

2007

INDICE DE CONTENIDOS

Página

1 RESUMEN	1
SUMARY	2
2 INTRODUCCION	3
3 MATERIALES Y METODOS	10
3.1 MATERIALES	10
3.1.1 Reactivos	10
3.1.1.1 Reactivos generales	10
3.1.1.2 Reactivos cultivo celular	10
3.1.1.3 Reactivos IFI	11
3.1.1.4 Anticuerpos	12
3.1.2 Equipos	13
3.2 METODOS	14
3.2.1 Cultivo celular	14
3.2.1.1 3T3	14
3.2.1.2 COS-7	15
3.2.1.3 Subcultivo	15
3.2.1.4 Conteo de células	15
3.2.1.5 Privación de Suero Bovino Fetal (SBF)	16
3.2.2 Transfección	17
3.2.2.1 Pasajera	17
3.2.2.2 Estable	18
3.2.3 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	19

3.2.3.1 Pro	eparación de cubreobjetos	19
3.2.3.2 Fij	jación de células	19
3.2.3.3 Inc	cubación de anticuerpos	19
3.2.3.4 Ti	nción nuclear	21
3.2.4 Microscopía	a	22
3.2.4.1 M	icroscopía de Epifluorescencia	22
3.2.4.2 M	icroscopía Confocal	22
3.2.5 Registro y a	análisis digital de imágenes	25
3.2.5.1 Re	egistro de imágenes	25
3.2.5.2 Ar	nálisis de imágenes	26
3.2	2.5.2.1 Co-localización	27
3.2	2.5.2.2 Transferencia de energía fluorescente de	29
res	sonancia (FRET)	
	3.2.5.2.2.1 Método de cálculo FRET	29
	3.2.5.2.2.2 Configuración de captura FRET	30
	3.2.5.2.2.3 Análisis digital de FRET	31
	3.2.5.2.2.4 Criterio de registro FRET,	31
	estequiometría 1:1	

4 RESULTADOS	34
4.1 Expresión de isoformas de V2R fusionadas a CFP.	34
4.2 Privación de SBF	38
4.3 Caracterización de organelas de la vía secretora	41
4.4 Análisis de Correlación de Intensidades (ICA)	46
4.5 Co-localización de isoformas de V2R con proteínas marcadoras	51
de organelas celulares.	
4.6 Localización de la isoforma V2a en la membrana plasmática.	56
4.7 NFRET entre oligomeros del receptor V2 de vasopresina.	60
4.8 Oligomeros del receptor V2 son detectados a nivel del RE y	65
alcanzan hasta el aparato de Golgi.	

5 DISCUSIÓN

6 CONCLUSIONES	78
U CONCEDEDIONED	70

7 BIBLIOGRAFIA	79

71

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1: Anticuerpos y reactivos utilizados en IFI.	
Tabla 2: Razón de fotomultiplicador entre los canales de detección	32
para CFP e YFP.	

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Configuración del camino óptico de CFP, YFP,	23-24
Alexa 488 y Alexa 633.	
Figura 2: Set de Filtros FRET (F), Aceptor (A) y Donante (D).	33
Figura 3: Caracterización de la expresión de V2aCFP y V2bCFP, en un	37
modelo de sobreexpresión.	
Figura 4: Efecto de la privación de SBF en células 3T3.	40
Figura 5: Distribución de marcadores de las organelas de la vía secretora	43-45
en células COS-7 y 3T3.	
Figura 6: Co-localización ICA.	49-50
Figura 7: Distribución de las variantes del Receptor V2 de vasopresina,	53-55
en la vía secretora.	
Figura 8: El receptor nativo V2a trafica hasta la MP, mientras	58-59
que la variante de empanne v20 es retenida intracentiamente.	

Figura 9: NFRET calculado para las tres situaciones de	62-64
oligomerización del receptor V2 de Vasopresina.	

Figura 10: NFRET de oligómeros de V2R, co-localizados con	67-70
marcadores de la vía secretora de proteínas.	

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

AVP: hormona arginina vasopresina.

BP: filtro pasa banda.

BSA: Albúmina de suero bobino.

CA: apertura confocal.

CFP: Proteína cyan fluorescente.

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco.

DNA: ácido desoxiribonucleico.

ERGIC: compartimiento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi.

ER: reticulo endoplásmico.

FRET: Transferencia de energía de resonancia fluorescente.

GABA: ácido γ-aminobutirico.

GABAR1: subunidad 1 del receptor de GABA.

GABAR2: subunidad 2 del receptor de GABA.

GFP: Proteína verde fluorescente.

GPCR: receptor acoplado a proteína G.

HCMV MIEP: promotor temprano de Citomegalovirus Humano.

ICA: análisis de correlación de intensidades.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

IgG: inmunoglobulina G.

IP3: inositol trifosfato.

MDM: espejo dicromático primario.

NDI: Diabetes nefrogénica insípida.

NFRET: FRET normalizado.

PBS: buffer fosfato salino.

QCS: sistema de control de calidad.

RNA: ácido ribonucleico.

ROI: región de interés.

SBF: suero bobino fetal.

SDM: espejo dicromático secundario.

UGGT: UDP glicoproteina glucosil transferasa.

V1: receptor V1a de vasopresina.

V3: receptor V1b de vasopresina.

V2a: receptor V2 nativo de vasopresina.

V2b: variante de empalme del receptor V2 de vasopresina de rata.

V2R: receptor V2 de vasopresina.

YFP: Proteína amarilla fluorescente.

1 RESUMEN

Arginina vasopresina (AVP) juega un papel importante en la regulación del balance electrolítico y en la función cardiovascular. AVP ejerce su función mediante la unión a receptores de membrana específicos acoplados a proteína G (GPCR), denominados V1, V2 y V3. La activación de receptores V2 a nivel de túbulos renales induce un aumento de los niveles intracelulares de AMPc, desencadenando el reclutamiento de canales de agua en la membrana plasmática produciendo un aumento en la reabsorción de agua. En el riñón de rata se expresa el receptor canónico denominado V2a y una variante de empalme denominada V2b, además esta última ejerce un efecto dominante negativo sobre la expresión en la membrana plasmática del receptor canónico, vía oligomerización. En este contexto el objetivo de esta tesis fue determinar la localización subcelular de las variantes de receptor V2, así como de sus oligómeros, para ello se implementó el análisis de *Fluorescent Resonant Energy* Transfer (FRET) y el método de co-localización de imágenes Intensity Correlation Analysis (ICA). Interesantemente se logró determinar que oligómeros entre las dos variantes del receptor V2, se observan a nivel del Retículo Endoplásmico, siendo detectados también en el tránsito hacia el aparato de Golgi. Además por medio del análisis morfológico de imágenes se logró determinar que sólo el receptor V2a alcanza el borde celular, mientras que V2b y las formas oligoméricas en las que este participe, quedan retenidas intracelularmente. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de oligómeros del receptor V2 en la membrana plasmática.

1.1 SUMMARY

Arginine vasopressin (AVP) plays an important role in regulating the electrolytic balance and cardiovascular function. AVP exercises its function by binding to specific membrane receptors coupled to G-protein (GPCR), called V1, V2 and V3. The V2 receptor activation in renal tubules induces an increase of intracellular levels of cAMP, triggering the recruitment of water channels in the plasma membrane causing an increase in the reabsorption of water. In the rat kidney expresses the canonical receptor called V2a and a splice variant called V2b, besides latter exerts a dominant negative effect on the expression of the canonical receptor in the plasma membrane via oligomerización. In this context, the objective of this thesis was to determine the subcellular localization of the V2 receptor variants, as well as their oligomers, so it was used the analysis of Fluorescent Resonant Energy Transfer (FRET) and the co-location images method of Intensity Correlation Analysis (ICA). Interestingly was determined that oligomers between the two variants of the V2 receptor, are found at an early stage in its biosynthesis, in the Endoplasmic Reticulum, even in transit to the Golgi apparatus. Also through morphological analysis of images was determined that only the V2b receptor reaches the cell edge, while V2b and his oligometrics forms, are retained intracellularly. However, it still has not detected the presence of V2 receptor oligomers in the plasma membrane.

2 INTRODUCCIÓN

El péptido de 9 residuos aminoacídicos denominado vasopresina es secretado en la glándula pituitaria (hipófisis) por terminales axónicos de neuronas ubicadas en núcleos hipotalámicos. Este neuropéptido en la mayoría de los mamíferos presenta el residuo arginina en posición 8 por lo cual se le denomina arginina vasopresina (AVP) (Ferguson and Heller 1965). Una de las funciones principales de AVP es la mantención de la volemia y el equilibrio electrolítico del organismo. La hormona lleva acabo esta importante función aumentando la permeabilidad al agua del epitelio de los túbulos renales y por este mecanismo inhibe la diuresis. Es por esto que también se le denomina hormona antidiurética (Klussmann *et al.* 2000).

Los receptores de AVP son proteínas intrínsecas de membrana pertenecientes a la superfamilia de receptores de superficie celular acoplados a proteína hétero-trimérica G (GPCR). Los GPCR se caracterizan por poseer una topología común, consistente de siete α -hélices hidrofóbicas de transmembrana, tres asas extracelulares, tres asas intracelulares, el extremo amino terminal extracelular y el carboxilo terminal citosólico (Premont *et al.* 1995; Wess 1998).

Para AVP, específicamente se han descrito tres tipos de receptores, codificados por genes distintos (Birnbaumer 2000), clasificados dependiendo del sistema de segundos mensajeros a los que acoplan la señalización y por su afinidad a una serie de análogos de la hormona AVP, éstos son V1 o V1a expresado principalmente en células hepáticas (Morel *et al.* 1993), V3 o V1b que se expresa mayoritariamente en

adenohipófisis (Thibonnier *et al.* 2001) y V2 que se expresa abundantemente en riñón (Saito *et al.* 1995).

Se ha observado que tanto los dominios de transmembrana, el extremo Nterminal, así como los dominios extracelulares de los GPCRs son importantes en la especificidad de unión al ligando, mientras que la región C-terminal y los dominios intracelulares participan en la regulación del acoplamiento a proteína hétero-trimérica G, fosforilación, internalización y tráfico a través de la vía secretora (Wu *et al.* 1998; Cao et al. 1999; Wang and Limbird 2002). Este tipo de receptores es activado por la unión del ligando en superficie celular, y en este estado es capaz de interaccionar y activar la proteína G, desencadenando una serie de reacciones hacia el lado citoplasmático de las células, modificando la concentración intracelular de segundos mensajeros. La activación de los receptores V1 y V3 de AVP, desencadena la hidrólisis de fosfatidilinositol y la movilización de calcio intracelular. Por otra parte la activación del receptor V2 en células principales del túbulo colector del riñón, desencadena la actividad de la enzima adenilato ciclasa incrementando los niveles intracelulares de AMPc (Thibonnier 1988), lo cual a su vez gatilla el reclutamiento de canales de agua (aquoporina 2) en la membrana plasmática para estimular la reabsorción de agua (Nielsen et al. 1995).

El gen del receptor de V2 posee tres exones y dos intrones; el primer exón codifica para los 9 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína, el segundo exón codifica para la secuencia que comprende desde el dominio transmembrana I al VI, por último el tercer exón codifica para la secuencia que

comprende el séptimo dominio transmembrana y el dominio C-terminal (Seibold *et al.* 1992).

En riñón de rata se ha demostrado mediante RT-PCR a partir de túbulos colectores aislados la presencia de dos productos de amplificación, un producto de 1.2kb con un marco de lectura que corresponde a la secuencia codificante para el receptor V2 canónico, y un segundo producto de 1.1kb. Este último se obtiene por empalme alternativo del transcrito primario del gen del receptor V2. Este empalme alternativo induce la utilización de un sitio aceptor 76 pb río-abajo, respecto del sitio de empalme utilizado en el procesamiento del receptor V2a canónico. La utilización de este segundo sitio aceptor implica una deleción de 76 nucleótidos (Firsov *et al.* 1994; Sarmiento *et al.* 2004). Por esta razón, de aquí en adelante el transcrito de 1.1kb se conoce como la variante de empalme alternativo es traducido a una proteína, la cual denominamos V2b, que se co-expresa con el receptor de vasopresina canónico, al cual denominamos V2a, en riñón de rata. La proteína V2b presenta idéntica secuencia aminoacídica con el receptor V2a hasta el residuo 303, pero posee 31 aminoácidos menos y un extremo C-terminal completamente distinto (Sarmiento *et al.* 2004).

Se ha demostrado que los GPCR son capaces de formar oligómeros, entre subtipos de un mismo receptor o entre receptores relacionados (Bouvier 2001). Se ha establecido que la capacidad de oligomerizar posee importantes efectos sobre las propiedades funcionales y farmacológicas de los GPCR (Wu *et al.* 1998; Cao *et al.* 1999). En particular se ha demostrado que la oligomerización de los GPCR cambia la especificidad del acoplamiento a la proteína G (Margeta-Mitrovic *et al.* 2000; Galvez *et*

al. 2001), así como también altera la endocitosis del receptor (Jordan and Devi 1999; Jordan *et al.* 2001; Lavoie *et al.* 2002).

Proteínas integrales de membrana, una vez plegadas y ensambladas en forma competente para su función, serán por defecto transportadas a través de la "vía secretora" hacia la membrana plasmática, a menos que contengan señales que las rescaten de este destino y dirijan o retengan en compartimentos intracelulares específicos como el lisosomal, aparato de Golgi o RE (Alberts 2002). Una importante barrera que estas proteínas deben sortear en su tránsito hacia la superficie celular, es el sistema control de calidad del plegamiento del RE, *quality control system* (QCS). En el QCS intervienen proteínas chaperonas (Bip, Calnexina, Calreticulina) residentes del RE, que estabilizan el péptido recién sintetizado hasta que éste alcance su conformación de plegamiento más estable. También participan proteínas residentes del RE con actividad catalítica disúlfuro isomeraza (PDI) que catalizan la formación de los enlaces disúlfuro entre residuos de cisteína intermoleculares e intramoleculares.

Además participan proteínas que censan el estado de plegamiento (UGGT). Sólo aquellas proteínas en las que su estado de plegamiento les permite escapar de la interacción con los componentes del QCS son exportadas del RE al aparato de Golgi, mientras que aquellas que no pueden escapar a esta interacción son retenidas en el RE y eventualmente destinadas a degradación lisosomal (Petaja-Repo *et al.* 2001).

Oligómeros de algunos GPCR son detectables a nivel del RE (Issafras *et al.* 2002; Overton and Blumer 2002; Floyd *et al.* 2003; Terrillon *et al.* 2003). En particular la capacidad de oligomerizar ha demostrado ser un requisito clave para la salida de

receptores GABAb y Beta-adrenérgicos del RE. Se ha postulado que la conformación obtenida en el oligómero ocultaría señales de rescate de la vía secretoria o regiones hidrofóbicas, que de estar expuestas condicionarían la retención intracelular de la proteína en el RE (Reddy and Corley 1998). Por ejemplo para el receptor metabotrópico GABAb humano, que posee dos subunidades, GABAb-R1 y GABAb-R2, se ha descrito que cuando solamente se expresa la isoforma GABAb-R1 en sistemas heterólogos, ésta no logra alcanzar la superficie celular y queda retenida como proteína inmadura en el RE. Sin embargo, cuando se co-expresan ambas isoformas, se recupera la expresión funcional en superficie celular como oligómero GABAb-R1.GABAb-R2 (White *et al.* 1998).

Interesantemente, consecuente con la temprana formación de los oligómeros de GPCR y su rol de retención, en varios estudios se ha reportado que isoformas mutadas de ciertos receptores tienen efecto dominante negativo sobre la expresión en superficie celular de sus respectivas formas nativas (Colley *et al.* 1995; Benkirane *et al.* 1997; Grosse *et al.* 1997; Zhu and Wess 1998; Karpa *et al.* 2000; Shioda *et al.* 2001).

En el contexto de lo señalado anteriormente, se ha descrito que los receptores de vasopresina podrían formar homo y hétero-dímeros, en una etapa temprana durante su biosíntesis (Terrillon *et al.* 2003; Sarmiento et al. 2004). Sin embargo, no se conoce cuál es la importancia funcional de la oligomerización, aunque se le asocia un rol en la regulación del tráfico celular de los receptores V1 y V2 (Terrillon *et al.* 2004), tal como ya se ha descrito para otros GPCR. Esto último está muy bien estudiado en mutaciones del receptor V2 humano de vasopresina, causantes de diabetes nefrogénica insípida (NDI) ligada al cromosoma X (Birnbaumer 1999), en donde el receptor no es capaz de

expresarse funcionalmente en la membrana basolateral de las células principales del túbulo colector del riñón, produciéndose un quiebre en el mecanismo fisiológico de la reabsorción de agua.

Las dos isoformas del receptor V2 de vasopresina de rata se expresan en sistemas heterólogos, sin embargo, mientras que V2a transita hasta la membrana plasmática, V2b es retenida intracelularmente y no es capaz de unir la hormona vasopresina. Además cuando ambas isoformas son co-expresadas, éstas son capaces de formar hétero-dímeros, e interesantemente la proteína V2b muestra un efecto dominante negativo sobre la expresión funcional en superficie celular de la proteína V2a (Sarmiento *et al.* 2004).

En función de estos antecedentes, surge la necesidad de preguntarse por el alcance que tienen las formas oligoméricas del receptor V2, en su tránsito por la vía secretora y más específicamente el sitio de retención de estas formas en modelos de expresión heterólogos. Para ello se plantea la siguiente **hipótesis de trabajo**:

El fenómeno de oligomerización ocurre durante la biosíntesis de los receptores.

Objetivo general: Estudiar el mecanismo de oligomerización durante el proceso de biosíntesis y maduración de los receptores V2 de vasopresina.

Objetivos específicos:

- Optimización de la detección de organelos celulares usando marcadores específicos.
- Determinar la localización subcelular de las isoformas V2a y V2b en la vía secretora mediante estudios de co-localización con marcadores de organelos subcelulares.
- Determinar homo-oligomerización y hétero-oligomerización mediante técnicas Transferencia de Fluorescencia por Resonancia (FRET).
- Co-localización de la señal de FRET con la de marcadores de organelos subcelulares.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos

3.1.1.1 Reactivos generales

Ácido clorhídrico (HCl), aceite de inmersión, cloruro de sodio (NaCl), hidróxido de sodio (NaOH), metanol absoluto (MeOH) e isopropanol fueron adquiridos a MERCK (Darmstadt, Alemania).

Cloruro de potasio (KCl), bicarbonato ácido de sodio (NaHCO3), fosfato de sodio dibásico (Na2HPO4), ampicilina, tampones para calibración (pH 4, 7 y 10) y azida de sodio (NaN3) fueron adquiridos a Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

Etanol 96% (EtOH) adquirido a Equilab (Valdivia).

3.1.1.2 Reactivos cultivo celular

Medio "Eagle" modificado por "Dulbecco" (DMEM), Medio "Ham's F12", Medio "Optimem", antibiótico antimicótico (Penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml, anfotericina 8 25 ug/ml), tripsina, poli-L-lisina, dimetil sulfóxido (DMSO) y azul tripano fueron adquiridos en Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA). El suero bovino fetal fué adquirido en Frigorífico Osorno (Osorno, X región, Chile) y se esterilizó por filtración e inactivó (56°C por 30 min.) en el laboratorio.

Reactivo de transfección "FuGENE 6" fue adquirido a Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA).

2.1.1.3 Reactivos IFI

Portaobjetos B&C de 3 x 1 pulgadas y 1-1,2 milímetros de espesor y Cubreobjetos Corning de 22 x22 milímetros y del número 1, fueron adquiridos a Equilab (Valdivia)

Reactivo de tinción nuclear "To-pro3" fue adquirido a Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

Medio de montaje para preparaciones celulares fluorescentes fue adquirido a DAKO (Carpintería, CA, USA).

Albúmina de suero Bovino (BSA) fue adquirida a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Anticuerpo policional anti-Calnexina generado en conejo y anticuerpo monocional anti-58K-9 generado en Ratón fueron adquiridos a Abcam (Cambridge, MA, USA).

Anticuerpo policional anti-Ergic53/p58 generado en conejo fue adquirido a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Anticuerpos secundarios policionales anti-inmunoglobulina G (IgG) de Ratón y anti-inmunoglobulina G (IgG) de Conejo, ambos generados en Cabra y conjugados a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 633, fueron adquiridos a Molecular Probes, Inc. (Eugene,OR, USA).

3.1.2 Equipos

Cámara de flujo laminar "NUAIRE" (clase II tipo A), pHmetro "WTW", estufa de cultivo termorregulada "Forma Scientific" con tubo de CO₂ comprimido, microscopio "NIKON TMS", microscopio de Epifluorescencia "ZEIS Axioscop" equipado con filtros de fluorescencia (métodos 3.2.4.1) y cámara fotográfica digital "Nikon", microscopio confocal "Olympus FLUOVIEW 1000" (métodos 3.4.2.2), centrifuga "Eppendorf 5415D", centrífuga clínica "Internacional Equipment CO. Modelo CL", baño termorregulado "MEMMERT" de 2 litros, bomba de vacío y vortex.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivo Celular.

Todas las líneas celulares fueron inicialmente descongeladas y sembradas sobre placas de 100mm de diámetro, con 10mL de medio de cultivo. Luego de aproximadamente un 80% de confluencia, fueron subcultivadas (métodos 3.2.1.4) utilizando medios de cultivo comerciales basados en el tampón carbonato (pH 7.4), dependiendo de los requerimientos de cada línea celular, y fueron mantenidas en una estufa de cultivo a 37°C y una atmósfera de 5.0% CO₂. Todo el manejo y tratamientos de células vivas se realizó en la cámara de flujo laminar. Además tuvieron varios pasajes antes de ser destinadas al cultivo en placas de 35mm con cubreobjetos pre-tratados para adherencia (métodos 3.2.3.1), en estas condiciones se llevó a cabo la transfección (métodos 3.2.2) de las variantes de V2R fusionadas a proteínas fluorescente y/o inmunofluorescencia (métodos 3.2.3) de marcadores de organelas celulares.

3.2.1.1 Células 3T3 (Fibroblastos de ratón albino Suizo).

Esta línea celular fue cultivada en el medio DMEM HG (Dulbecos Modificated Eagle Médium High Glucose), suplementado con SBF a una concentración de 7.5% final, y con una mezcla de antibiótico/antimicótico comercial (ver materiales).

3.2.1.2 Células COS-7 (Riñón de Mono verde Africano).

Para esta línea celular, se utilizó una mezcla de los medios comerciales para cultivo celular: F12 (HAM) y DMEM LG (*Dulbecos Modificated Eagle Medium Low Glucose*); en proporción 1:1, suplementado con SBF a una concentración de 7,5% final, antibiótico/antimicótico y L-Glutamina 2mM final.

3.2.1.3 Subcultivo.

En condiciones estériles se eliminó el medio por aspiración con bomba de vacío, luego de ésto las células fueron incubadas en tripsina-EDTA en cámara de cultivo a 37°C, 5% CO₂ y pH 7.4, por un tiempo que, dependiendo del tipo celular, oscila entre 1 y 15 minutos. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 10 mL de medio de cultivo, y eventualmente contadas en cámara Neubawer (métodos 3.2.1.5) antes de ser sembradas en cubreobjetos pre-tratados con poly L-Lisina..

3.2.1.4 Conteo de células.

Todas las líneas celulares fueron contadas de la misma forma. Una placa Petri de 100mm con células en confluencia fue tripsinizada (métodos 3.2.1.4), y las células resuspendidas en 10 mL de medio de cultivo. Se tomó una alícuota de 100µL a partir de la suspensión de células, y se diluyó en otros 100µL del colorante vital azul tripano; de esta última mezcla se cargó una gota en cámara Neubauer 1/10mm y se contaron 4 cuadrantes en un microscopio de luz transmitida. El cálculo del número de células por mL se determinó mediante el siguiente cálculo: N°Cél. / mL = (Σc / 4) x 2 x 1x10⁴. En donde $\Sigma c / 4$ es el promedio de la sumatoria de los cuatro cuadrantes, 2 es el factor de dilución y 1×10^4 es el factor de profundidad de la cámara.

3.2.1.5 Privación de Suero Bovino Fetal (SBF).

Las células fueron descongeladas (métodos 3.2.1) y luego del primer pasaje fueron sometidas al cultivo en medio conteniendo 7.5%, 5.0%, 2.5% y 0.0% de SBF. Sólo mientras transcurren las últimas 24h de cultivo, en todos los casos el SBF es descartado por completo del medio, tanto en células destinadas para IFI como las que fueron tranfectadas.

3.2.2 Transfección.

Se utilizó el mismo protocolo de transfección para todas las líneas celulares, haciendo diferencia sólo cuando se trata de transfección pasajera o estable. Se utilizaron los plasmidios pEGFPN1, pECFPN1 y pEYFPN1 con los receptores V2a y V2b, clonados en marco de lectura hacia el amino terminal de las variantes de la proteína fluorescente (Sarmiento 2005). Se realizaron transfecciones independientes del plasmidio codificando las dos isoformas del receptor V2 de rata (V2a y V2b), como proteínas de fusión a la variante *Cyan* de la proteína verde fluorescente (V2a.CFP y V2b.CFP); además se realizaron co-transfecciones de estas construcciones, en combinaciones que permiten el estudio de la transferencia de energía (métodos 3.2.6.2.2) para las tres situaciones de oligomerización. También se hicieron transfecciones pasajeras de los vectores vacíos, para expresar individualmente o co-expresar sólo las proteínas fluorescentes.

3.2.2.1 Transfección pasajera.

Las transfecciones pasajeras se llevaron a cabo en células COS-7 cultivadas sobre placas de 35mm. Se utilizó el reactivo de transfección "FuGENE 6" en una proporción 3:1 (volumen reactivo/masa DNA), según instrucciones del fabricante. 24h antes de ser transfectadas se sembraron $1x10^5$ células, sobre placas de 35mm con cubreobjeto, 3h antes de la transfección se cambió medio fresco a las células. Para la transfección se preparó una mezcla consistente de 100 µL de medio "OptiMEM" y 3µL de "FuGENE 6", esta mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 minutos a T° ambiente, luego de ésto se agregó 1µg del DNA total a transfectar y se incubó por 15

minutos. En el caso de las co-transfecciones se agregaron masas iguales de ambos plasmidios, completando siempre 1µg de DNA total. Luego se agregó esta mezcla directamente sobre la placa, agitando suavemente, entonces se mantuvo las células en la estufa de cultivo, hasta ser procesadas para observación por microscopía.

3.2.2.2 Transfección estable.

En células 3T3 se realizaron co-transfecciones estables de V2a y V2b fusionados a las variantes de la proteína fluorescente verde CFP e YFP, en combinaciones tales que permiten el estudio de la transferencia de energía en las distintas situaciones de oligomerización, así como también de la proteína de fusión CFP-YFP utilizada como control positivo de la transferencia de energía. Se transfectaron 6 µg de DNA total, mezclados con 12 µl del reactivo "FuGENE 6" (proporción 1:2 establecida en el laboratorio). Se preparó una mezcla de transfección consistente de 600 µL de medio DMEM HG y 12µL de "FuGENE 6", esta mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 minutos a T° ambiente, luego de ésto se agregó 6µg del DNA total a transfectar y se incubó por 15 minutos. En el caso de las co-transfecciones se agregaron masas iguales de ambos plasmidios, completando siempre 6µg de DNA. Luego se agregó esta mezcla directamente sobre placas de cultivo de 100 mm de diámetro las cuales contenían 1,5 x 10⁶ células por ml de cultivo, agitando suavemente, entonces se incubó por un tiempo de 48h en la estufa de cultivo. El proceso de selección fue iniciado a las 48 h posttransfección utilizando el antibiótico G418 (Geneticina) 1mg/ml y se continuó por 2 semanas adicionales, transcurridas las cuales las colonias resistentes al antibiótico fueron aisladas por medio de cilindros de clonamiento.

3.2.3 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

3.2.3.1 Preparación de cubre objeto.

Cubreobjetos de 22 x 22 mm de área y del N° 1 de espesor fueron lavados con Etanol 95%, secados y sumergidos en una solución de poly L-Lisina 0.01% (70.000 g/mol) por 5 minutos, inmediatamente fueron puestos en placas de 35mm de diámetro, y expuestas por 20 minutos a radiación UV e inmediatamente dispuestos para la siembra de células o mantenidos a 4°C para su posterior uso.

3.2.3.2 Fijación de células.

Las células son lavadas 3 veces por 5 minutos en PBS 1X a temperatura ambiente, luego fijadas por 45 minutos en metanol 100% a – 20°C, luego tres lavados por 5 minutos con PBS 1X. Hasta este punto las células están listas para la IFI, sin embargo de rutina se realizó un paso extra de deshidratación en una batería de Etanol 50%, 70% y 100%, con el objeto de guardar los cubreobjetos con células fijadas a -80°C hasta la realización de la IFI. Este último procedimiento preserva la morfología y no altera la accesibilidad de los anticuerpos para la IFI.

3.2.3.3 Incubación con anticuerpos.

Los anticuerpos, y otros reactivos usados en esta tesis son detallados a continuación, en su combinación y título para cada organela observada:

Organela	1° Anticuerpo/Titulo	2° Anticuerpo/titulo
Núcleo	To-Pro 3* / 1:5000	
		Cabra anti-Conejo/1:1000
Retículo	anti-Calnexina /1:1000	(conjugado a Alexa fluor 488
Endoplásmico	(poly-clonal Conejo)	o 633)
		Cabra anti-Conejo/1:2500
	anti-Ergic-53 /1:500	(conjugado a Alexa fluor 488
ERGIC	(poly-clonal Conejo)	o 633)
		Cabra anti-Ratón/1:2500
Aparato de	anti-58K-9 /1:2500	(conjugado a Alexa fluor 488
Golgi	(mono-clonal Ratón)	o 633)

Tabla 1.- Anticuerpos y Reactivos utilizados en IFI.

En esta tabla se muestran los anticuerpos usados para marcar las organelas de la vía secretora y los títulos que se usaron para la IF. * Este es un reactivo intercalante de DNA doble hebra, con un max. exc. 633 nm.

Luego de métodos 3.2.3.2, las células fueron lavadas 3 veces en PBS 1X, bloqueadas por 30 minutos en BSA 2% preparado en PBS 1X y suplementado con 2mM de azida de sodio (NaN3), luego de ésto se montó el cubreobjeto con las células orientadas hacia una gota de 70 uL de la dilución del 1° anticuerpo preparado en una solución de BSA al 2%, más 100ug/mL de IgG de cabra (eliminar interacciones inespecíficas), dispuesta sobre papel "Parafilm" y se dejaron toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Luego de ésto se lavaron las células seis veces por 2 minutos en PBS 1X y se montaron sobre 70 uL de una dilución del 2° anticuerpo preparado en una solución de BSA al 2%, por 2 h a 4°C. Luego de ésto se lavaron las células seis veces por 2 minutos en PBS 1X y se deshidrataron en una batería de etanol 50%, 70% y 100% por 5 minutos cada uno, se secaron y montaron sobre una gota de medio de montaje DAKO en un portaobjetos. Se dejaron secar por un día a 4°C y oscuridad, para luego ser observadas en el microscopio de epifluorescencia o en microscopio confocal.

3.2.3.4 Tinción nuclear.

Una vez fijadas (esta tinción puede realizarse luego de la incubación de anticuerpos), las células fueron lavadas 3 veces por 5 minutos en PBS 1X y posteriormente incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, en una dilución 1/5000 del reactivo To-pro3 en PBS 1X. Finalmente las células se lavaron 6 veces por 2 minutos en PBS 1X y se deshidrataron en una batería de etanol 50%, 70% y 100% por 5 minutos cada uno, se secaron y montaron sobre una gota de medio de montaje "DAKO" en un portaobjetos, se dejaron secar por un día a 4°C y oscuridad, para luego ser observadas en el microscopio de epifluorescencia o en microscopio confocal.

3.2.4 Microscopía.

3.2.4.1 Microscopía de Epifluorescencia.

Se utilizó un microscopio de epifluorescencia "ZEIS Axioscop", equipado con una lámpara de fluorescencia "HBO 50" y los siguientes set de filtros:

GFP/Alexa 488 (set 10).	BP 450 – 490; FT 510; BP 515 – 565
YFP (set 46).	BP 490 – 510; FT 515; BP 520 – 550
CFP (set 47).	BP 426 – 446; FT 455; BP 460 – 500

3.2.4.2 Microscopía confocal.

Se utilizó un microscopio confocal "OLYMPUS FLUOVIEW 1000", equipado con una línea láser de diodo de 440nm, láser Helio-Neón-R de 633nm, láser Helio-Neón-G de 543nm y un láser Argón multilínea de 458, 488 y 515nm. La observación y registro se realizó con un objetivo de inmersión en aceite "UPlan SAPO 60X/1.350il $\infty/0.17$ /FN26.5". Las configuraciones del camino óptico utilizado para cada fluoróforo se detallan a continuación:







Alexa 633.



Fig 1.- Configuración del camino óptico de CFP, YFP, Alexa 488 y Alexa 633. Configuraciones del camino óptico utilizado en el microscopio confocal, para la observación y registro de los fluoróforos CFP, YFP, Alexa 488 y Alexa 633.

3.2.5 Registro y Análisis digital de imágenes.

3.2.5.1 Registro de imágenes.

Para las imágenes tomadas del microscopio de epifluorescencia el registro de imágenes se realizó con una cámara "Nikon" adaptada para este microscopio. Las imágenes fueron colectadas en formato Tif RGB con una resolución de 640X480 pixeles.

En el microscopio confocal las imágenes fueron capturadas configurando distintos canales de detección para cada fluoróforo, cada canal de detección posee un fotomultiplicador independiente; además el *software* Fluoview 1000 que provee el fabricante y que opera el microscopio, permitió digitalizar imágenes en el formato Tiff con una profundidad de 12 *bits* en escala de grises y con una resolución de 1024 X 1024 pixeles. Las imágenes fueron tomadas con la apertura confocal (AC) sugerida por el *software* para cada fluoróforo, conservando la AC del fluoróforo de menor longitud de onda de excitación, cuando se realizaron registros de más de un canal a la vez; los valores de "Ganancia" y "Offset" se mantuvieron constantes para imágenes de un mismo set de experimentos, sin embargo el voltaje del fotomultiplicador se ajustó independientemente para cada imagen, dependiendo de la relación señal/ruido en la imagen.

Todo el análisis de imágenes se realizó mediante el software "WCIF ImageJ", unprogramagratuitodedominiopúblico(http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/fdownload.html).ConlafunciónImage/Type/8 bit, las imágenes registradas en el microscopio de epifluorescencia fuerontransformadas a escala de grises con una profundidad de 8 bit, y ajustado el mejordespliegue de intensidades mediante la función Image/Adjust/Brightness/Contrast.

Para la selección de regiones de interés (ROI) morfológicas, se utilizó el *plug-in* "Multi Cell Outliner", el cual permite hacer selecciones de regiones discriminadas por un valor umbral de intensidad en la escala de grises (variable), e ingresar las coordenadas en el plano (x,y) en donde buscar dicha región.

Sólo imágenes crudas tomadas con el microscopio confocal, fueron sometidas al análisis digital de la co-localización y al cálculo del FRET (Transferencia de energía fluorescente de resonancia). El análisis de co-localización se realizó mediante el algoritmo matemático ICA (*Intensity Correlation Analysis*), del cual se ha desarrollado un *plug-in* para aplicar en el *software* WCIF ImageJ (Li *et al.* 2004), la ruta de esta aplicación en el *software* es *Plugins/Colocalisation Analysis/Intensity Correlation Analysis* y su fórmula de cálculo es la siguiente:

$$ICA = (I_{ia} - \overline{I}_{a})(I_{ib} - \overline{I}_{b})$$

En donde: I_{ia} es la intensidad de un píxel cualquiera en la imagen A, \bar{I}_a es la intensidad promedio de la imagen A, y la misma situación ocurre para el segundo binomio que corresponde a la imagen B. El algoritmo se sustenta en la hipótesis de que si dos proteínas forman parte de un mismo complejo o estructura, entonces sus intensidades registradas en imágenes independientes aumentarán o disminuirán en sincronía. En la fórmula el producto se hace positivo cuando en ambas imágenes un mismo pixel aumenta o disminuye sincrónicamente con respecto a los promedios, entendiéndose esta situación como de co-localización (dependencia de las señales); por el contrario si la variación de un mismo pixel en ambas imágenes no presenta sincronía, el producto es negativo, entendiéndose como no co-localización (segregación de las señales).

Para la co-localización con ICA se utilizaron imágenes normalizadas y en una profundidad de 8 bit, eliminando los pixeles saturados y escogiendo ROIs morfológicas que delimitan la distribución de los marcadores de organelas celulares.
La fracción de pixeles co-localizados entre dos imágenes analizadas, está compuesta por aquellos pixeles que aumentan sincrónicamente respecto al valor promedio en ambas imágenes (denominados Ve+), y por aquellos que disminuyen sincrónicamente respecto del promedio en ambas imágenes (denominados Ve-). Las bajas intensidades del ruido y la señal de auto-fluorescencia intrínseca de las células, son responsables de la mayor parte de los valores Ve- generados en el análisis ICA; por esta razón, esa fracción de pixeles fue sesgada como información útil para esta tesis. Los valores Ve+, están pseudo-coloreados con la *lut* Fire, la cual sólo muestra las diferencias en la cantidad de fluoróforo presente en las imágenes co-localizadas, no así en el nivel de co-localización, puesto que ésta es absoluta, independiente del despliegue de intensidades en la imagen.

3.2.5.2.2 Transferencia de energía fluorescente de resonancia (FRET).

Para determinar la transferencia de energía, se utilizó el par de fluoróforos CFP e YFP (variantes de la proteína fluorescente verde), fusionadas a las dos isoformas descritas para el receptor V2. En células 3T3 fueron co-transfectados de forma estable (ver 3.2.2.2) e independientemente las construcciones necesarias para la formación de los dos homo-oligómeros y el hétero-oligómero (V2aCFP + V2aYFP, V2bCFP + V2bYFP y V2aCFP + V2bYFP). Paralelamente en células COS-7, se co-transfectaron pasajeramente las mismas construcciones, además de las proteínas solubles CFP e YFP para calcular la transferencia de energía colisional (control negativo) y por último se transfectó de forma pasajera la proteína de fusión CFP-YFP, esta construcción posee un link de 15 aminoácidos que une a las dos proteínas, suficiente para que ocurra la transferencia de energía (control positivo). Por otra parte, se transfectaron de forma pasajera e independientemente las proteínas solubles CFP e YFP, para estimar los SBTs (Spectral Bleed-throughs), estos son factores de corrección necesarios para el método de cálculo del FRET.

3.2.5.2.2.1 Método de cálculo FRET

Para el cálculo del FRET se utilizó el método de los tres set de filtros (Fig 2) (Gordon *et al.* 1998), normalizado (Xia and Liu 2001), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$NFRET = \frac{Ff - \left[Af \left(Fa \middle/ Aa \right) + Df \left(Fd \middle/ Dd \right)\right]}{\sqrt{Afa \times Dfd}}$$

En la cual se utiliza la nomenclatura propuesta por Gordon *et al* (1998). Aa y Fa representan a las imágenes obtenidas con el set de filtros Aceptor y FRET, respectivamente, cuando sólo el fluoróforo aceptor está presente en la muestra, mientras que Dd y Fd representan imágenes obtenidas con el set de filtros del Donante y FRET, respectivamente, cuando sólo el fluoróforo Donante está presente en la muestra. Ff, Af, y Df representan imágenes obtenidas con el set de filtros FRET, Aceptor y Donante respectivamente, cuando ambos fluoróforos están presentes en la muestra. El denominador de esta ecuación corresponde a la normalización propuesta por Xia *et al* (2001), en donde Dfd y Afa corresponden a las imágenes del donante y aceptor de energía obtenidas con el set de filtros D y A respectivamente, cuando ambos fluoróforos están presentes.

3.2.5.2.2.2 Configuración de captura FRET

Las imágenes fueron colectadas en un microscopio confocal "Olympus Fluoview 1000" (métodos 3.2.6.1). Para el set de filtros del donante de energía (fig 2 D), la excitación se realizó mediante un láser de diodo de 440nm, además de un espejo dicroico primario MDM 405-440/515, mientras que la luz de emisión fue capturada en el primer canal utilizando el espejo dicroico secundario SDM 510 y un filtro pasa banda BP 465-495. Para el set de filtros del aceptor de energía (fig 2 A), la excitación se realizó con un láser de Argón de 515nm y un espejo dicroico primario MDM 405-440/515, mientras que la luz de emisión se capturó en el segundo canal utilizando los espejos dicroicos secundarios SDM 510 y SDM 640 consecutivamente, y un filtro pasa banda BP 535-565. Para el set de filtros FRET (fig 2 F) se utilizó un láser de diodo de 440nm y el espejo dicroico primario MDM 405-440/515 para la excitación, mientras

que la emisión fué capturada en el segundo canal utilizando los espejos dicroicos secundarios SDM 510 y SDM 640 consecutivamente y un filtro pasa banda BP 535-565.

3.2.5.2.2.3 Análisis digital de FRET

La transferencia de energía fue evaluada mediante el *Plug-in* PixFRET (Feige *et al.* 2005) una aplicación del *software* WCIF ImageJ disponible gratuitamente en el sitio *Web <u>http://www.unil.ch/cig/page16989.html</u>. Esta aplicación se basa en el método de los tres set de filtros e introduce una corrección de los factores SBTs, permitiendo ajustarlos en una curva constante, lineal o exponencial con respecto a la intensidad de cada fluoróforo; además requiere de la construcción de tres <i>stack* de imágenes: i) FdDd, ii) FaAa y iii) FfDfAf. En el análisis no se consideraron los pixeles saturados, eliminándolos de los stack mediante una máscara de saturación generada con el *software* WCIF ImageJ. Por otra parte, también se eliminaron del *stack* FfDfAf aquellos pixeles que no muestran co-localización mediante ICA entre Df y Af, esta modificación del método de cálculo se sustenta en la lógica de que la transferencia de energía sólo puede ocurrir en aquellas regiones en las que ambos fluoróforos se encuentren distribuidos de forma dependiente (criterio de co-localización).

3.2.5.2.2.4 Criterio de registro FRET, estequiometría 1:1

Mediante la construcción CFP-YFP, que fue utilizada para evaluar una situación de FRET control y en la que se tienen ambos fluoróforos en una estequiometría 1:1, se estableció una relación numérica entre los valores de PMT utilizados para el registro de los fluoróforos en el canal de detección respectivo y manteniendo todas las restantes variables de captura constantes (tabla 2), con este simple análisis se determinó un valor constante de 1.2, este valor se uso para condicionar el registro del FRET con una proporción 1:1 entre fluoróforos, en las co-transfecciones de las isoformas del receptor V2, como proteínas de fusión a CFP e YFP.

Célula	Canal D PMT	Canal A PMT	Razón D/A
1	481	401	1.19
2	406	338	1.20
3	473	394	1.20
4	514	428	1.20

 Tabla 2.- Razón de fotomultiplicador entre los canales de detección para CFP e

 YFP.

En el microscopio confocal, se estableció una razón entre los valores de fotomultiplicador (PMT) utilizados en el registro de los fluoróforos CFP (canal D) e YFP (canal A), en células transfectadas con la proteína de fusión CFP-YFP.



Figura 2.- Set de Filtros FRET (F), Aceptor (A) y Donante (D). Configuraciones utilizadas para implementar el método de los tres set de filtros en microscopio confocal "Olympus FLUOVIEW 1000". La línea punteada indica el camino óptico de la señal registrada por el detector bajo cada configuración de filtros.

4 RESULTADOS

4.1 Expresión de isoformas de V2R fusionadas a CFP

Con el propósito de caracterizar la expresión en sistemas heterólogos de las isoformas del receptor V2 de vasopresina (V2a y V2b), fusionadas a la variante *Cyan* de la proteína verde fluorescente, se realizaron transfecciones pasajeras en células COS-7 (ATCC CRL-1651). Ésta es una línea celular derivada de fibroblastos de riñón de mono CV-1, por transformación con una mutante origen-defectuosa del virus SV40, que además expresa constitutivamente el antígeno T grande (Gluzman 1981).

El producto de genes tempranos del virus SV40, antígeno T grande, es un promiscuo activador de promotores virales y eucarióticos simples, tales que contengan una caja TATA o un elemento iniciador y al menos un sitio de unión al factor de trascripción río arriba (Gilinger and Alwine 1993). En relación a esto último, se ha demostrado que el antígeno T grande trans-activa el HCMV MIEP (*Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Promoter*), hasta 9 veces su actividad normal (Moens *et al.* 2001). Por último, cabe señalar que el vector de expresión utilizado en esta tesis, para transfectar las distintas construcciones en células COS-7, fue el plasmidio pEXFP-N1 (CLONTECH), el cual posee el promotor HCMV MIEP río arriba respecto del sitio de clonamiento múltiple y además posee un sitio de replicación episomal para el antígeno T grande.

En este contexto, COS-7 se presenta como un modelo experimental de sobreexpresión de proteínas. Se decidió la utilización de esta línea celular, debido a su crecimiento relativamente rápido, por su facilidad en la transfección por métodos comerciales y por las características de expresión ya mencionadas, las que permiten hacer un registro de imágenes con una señal de gran calidad (buena relación señal/ruido).

Se transfectó 1µg del DNA plasmidial conteniendo la construcción V2aCFP o V2bCFP. La expresión de tales construcciones fue evaluada a las 48 horas. De esta forma, las células se observaron bajo una magnificación de 40X y 100X en el microscopio de epifluorescencia. Esta primera aproximación al estudio de tales proteínas, en el modelo experimental COS-7, permite observar sin mayor dificultad y con una marcada tendencia un perfil de expresión más bien heterogéneo dentro de la población de células, con una gama que va desde una distribución de tipo reticular (Fig 3, A y C), hasta otra con una marcada tendencia hacia una región yuxtanuclear puntual (Fig 3, B y D).

La simple observación de la distribución de estas proteínas, no entrega un resultado en sí, pero deja en claro un problema necesario de enfrentar previo a cualquier análisis, y que está relacionado con la heterogeneidad inherente al modelo biológico. Se ha determinado, mediante técnicas de microscopía confocal en células vivas, que las estructuras que componen la vía secretora de proteínas de membrana, tales como RE y aparato de Golgi, tienen una organización dinámica en relación al ciclo celular; específicamente, durante la mitosis, el aparato de Golgi sufre una desestructuración, fusionándose con membranas del RE en etapas intermedias y reorganizándose como una estructura completamente independiente hacia el final de la división celular (Zaal *et al.* 1999).

En este contexto, se observó en COS-7 un considerable número de células en estado de división activa, ésto implica que las estructuras que componen la vía secretora están en constante cambio, desde el punto de vista morfológico. Debido a que en esta tesis se trabaja con técnicas de célula única, en las que sólo es posible observar el estado estacionario de un modelo poblacional, surge la necesidad de homogenizar al máximo el ciclo celular y lograr que el perfil de expresión de proteínas en célula única represente lo que ocurre en la población en general.



Figura 3.- Caracterización de la expresión de V2aCFP y V2bCFP, en un modelo de sobreexpresión.

La línea celular COS-7 se utilizó como modelo de sobreexpresión de proteínas. Estas células fueron transfectadas independiente y pasajeramente utilizando 1µg de un plasmidio conteniendo la construcción V2aCFP ($A \ y \ B$) o V2bCFP ($C \ y \ D$), y la expresión de estas proteínas fue evaluada a las 48 horas de transfección. En la figura se distinguen claramente dos patrones de expresión; distribución de tipo reticular ($A \ y \ C$) y otra con una marcada acumulación hacia una región yuxtanuclear ($B \ y \ D$) para cada construcción. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia con una magnificación de 100X.

4.2 Privación de SBF.

La principal razón por la que se realizó la privación de SBF, es la de lograr sincronizar el ciclo celular dentro de la población, en un estado que permita una mejor diferenciación morfológica de las estructuras que componen la vía secretora de proteínas. Existen variados métodos de controlar el ciclo celular, la privación de SBF es uno muy sencillo y efectivo que se ha descrito y utilizado para frenar el crecimiento celular y detener el ciclo en G_0 (Kues *et al.* 2000). Mediante Microscopía de Fluorescencia, se evaluará el efecto que tiene el privar de SBF a células COS-7 y 3T3, sobre la distribución de marcadores de organelas intracelulares.

Debido a que la línea celular 3T3 no expresa el antígeno T grande, esta será utilizada como un modelo experimental control, respecto de la sobre-expresión argumentada en células COS-7, además de ofrecer un punto de comparación y validación de la técnica de IFI.

El efecto que tiene el privar SBF en una población de células en monocapa, será evaluado sobre la distribución del aparato de Golgi mediante la técnica de IFI, para ello se cultivaron las células hasta alcanzar un 80% de confluencia aproximadamente, luego de ésto se privó el SBF durante 24 horas, y finalmente se realizó IFI contra la proteína 58K, residente del aparato de Golgi.

La proteína 58K es una proteína periférica de membrana, presente en todo el aparato de Golgi, a la cual se le asocia una función de anclaje de esta organela con microtúbulos (Bloom and Brashear 1989).

El efecto del tratamiento fue el mismo en ambos tipos celulares, pero notoriamente marcado en células 3T3. En la figura 4 se observa lo que ocurre en este último tipo celular; el perfil de distribución del marcador del aparato de Golgi cambia drásticamente, éste se condensa y se reúne en una región yuxtanuclear, y el efecto ocurre en toda la población. Consistentemente ya no se observan células en estado de división celular en la población.



Figura 4.- Efecto de la privación de SBF en células 3T3.

Dos placas con células 3T3 fueron cultivadas en medio completo hasta lograr un 80% de confluencia, luego durante 24 horas una placa se mantiene en medio completo (A) y la otra en medio sin SBF (B). Finalmente las células se fijaron y se les realizó IFI, incubando con anti-58K-9 (1/1000) toda la noche a 4°C y Goat anti Mouse-Alexa488 (1/2500) incubado 2h a 4°C. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia con una magnificación de 100X.

4.3 Caracterización de organelas de la vía secretora.

Las dos isoformas del receptor de vasopresina en estudio (V2a y V2b), son proteínas intrínsecas de membrana, cuya síntesis y transporte está asociado al tránsito por la vía secretora. Con el ánimo de caracterizar esta ruta en distintos modelos celulares y en condiciones de privación de SBF, se llevó a cabo la técnica de IFI en células COS-7 (fig. 5 I) y 3T3 (fig. 5 II), mediante el uso de anticuerpos comerciales, dirigidos específicamente contra proteínas con una alta tasa de residencia en las tres organelas principales de la vía secretora; un anticuerpo policional generado en conejo dirigido contra la proteína Calnexina del RE, otro anticuerpo policional generado en conejo dirigido contra la proteína Ergic-53 del compartimiento vesículo-tubular ERGIC y por último un anticuerpo monocional generado en ratón dirigido contra la proteína 58K del aparato de Golgi. Las IFIs se completaron con un segundo anticuerpo conjugado al fluoróforo Alexa 488, dirigido contra la IgG de la especie en que fue generado el primero (métodos 3.2.3.3).

En ambos tipos celulares se puede observar una clara diferenciación en la distribución de cada marcador, a la luz de la distribución de sus respectivas proteínas marcadoras. El RE se muestra como una red ampliamente distribuida por todo el citoplasma; ERGIC no muestra una morfología bien definida, pero sí una distribución mayoritaria hacia una región peri-nuclear y que se atenúa hacia el resto del citoplasma; por último el aparato de Golgi muestra una distribución morfológica muy compacta y definida en una región yuxtanuclear. En todas las imágenes se observa señal de IFI en la región nuclear, al parecer ésto es sólo un artefacto de la técnica, pues la señal es constante en ambos tipos celulares y en todas las células de un mismo campo, sin

embargo la relación señal/ruido en las imágenes es suficiente para su discriminación. Por último la identificación del Núcleo celular, mediante el uso del reactivo "To-pro3" (métodos 3.2.3.4), entrega una muy buena herramienta referencial, tanto dentro de una célula única como en un campo completo.





Fig 5.- Distribución de marcadores de las organelas de la vía secretora en células COS-7 y 3T3.

Células COS-7 (panel I) y 3T3 (panel II) fueron cultivadas en medio completo (7,5% FBS) y luego de 48h se privaron de SBF, manteniendo el cultivo por otras 24h. Posteriormente las células se fijaron y se realizaron IFIs contra proteínas marcadoras de RE, ERGIC y aparato de Golgi (B, E y H respectivamente, ambos paneles). Además se realizó una tinción con el reactivo "ToPro-3" 1/5000 por 30 minutos para marcar el Núcleo (A, D y G en ambos paneles). Mediante microscopía confocal se colectaron imágenes con una AC de 100 µm, una magnificación de 60X y zoom 2, luego se realizó una superposición digital de la imagen de la organela y su correspondiente imagen de núcleo (C, F, I en ambos paneles).

4.4 Análisis de Correlación de Intensidades (ICA).

El algoritmo matemático ICA (*Intensity Correlation Análisis*), es utilizado en esta tesis con el objeto de entender y evaluar la co-localización de dos proteínas independientes, cuyas señales de fluorescencia han sido registradas en imágenes, mediante microscopía confocal. ICA está basado en la relación de intensidades existente entre dos imágenes digitales, tomando como referencia el valor promedio de dichas intensidades para cada imagen. Por lógica se puede establecer que si dos proteínas forman parte de un mismo complejo, entonces sus intensidades, representadas en la imagen, variaran en forma sincrónica; si por el contrario dos proteínas no pertenecen al mismo complejo o estructura, sus correspondientes intensidades variaran de forma asincrónica; Li *et al* denominaron a estas dos situaciones, relación de "dependencia" y "segregación" (entre dos imágenes) respectivamente.

Para este algoritmo, descrito con mayor detalle en métodos 3.2.5.2.1, se ha desarrollado una aplicación implementada en el *software* WCIF ImageJ, que permite realizar un análisis pixel por pixel entre dos imágenes, discriminando aquellos pixeles con una relación de dependencia (ICA (+)) de aquellos con una relación de segregación (ICA (-)). Por otra parte, la fracción de pixeles ICA (+), se puede descomponer en aquellas intensidades que varían sincrónicamente por sobre el promedio, denominadas Ve+, y en aquellos pixeles cuya sincronía se presenta por debajo de los valores de intensidad promedio, denominados Ve-. Este último grupo de pixeles (Ve-), pertenecen a la categoría de relación "aleatoria" entre las dos imágenes, con valores de intensidad que tienden a 0 y que caen en el dominio de las bajas intensidades del ruido y señal de auto-fluorescencia intrínseca.

En la figura 6 panel I, se observan las imágenes de las proteínas V2aCFP (A) y V2bYFP (B) co-transfectadas pasajeramente en células 3T3 sometidas a la colocalización por superposición de imágenes (C) y por ICA (D) en un contexto global. Para la señal de ambos fluoróforos (A y B) se realizó una substracción de *background* igual al promedio de una región de la imagen que no tiene señal, posterior a ésto se desplegaron ambas imágenes en 8 *bit* y se extraen los pixeles que están saturados (con valor máximo), el azul en las imágenes corresponde a los pixeles con valor 0; sólo entonces se realizó la co-localización. Esta forma de analizar las imágenes, sugerida por Li *et al*, no modifica ni altera la información de intensidades contenida en la imagen, pues sólo elimina aquellos pixeles que están fuera del rango de detección, los cuales desde el punto de vista del análisis no muestran información útil. Por último, el resultado es una imagen de co-localización en la que se muestran en tonos dorados las regiones que presentan dependencia y en tonos azules las regiones que presentan segregación, mientras que en negro se muestra la zona en donde la distribución es aleatoria (Ve-).

Si bien la superposición de imágenes muestra un indicio de co-localización, este criterio es ambiguo, subjetivo y con poco poder resolutivo en cuanto a la definición de estructuras y regiones de co-localización. Por otra parte, la co-localización por ICA cubre todas estas falencias de la superposición de imágenes, sin embargo muestra algunas incongruencias artefactuales, como por ejemplo co-localización de pixeles que tienden al valor 0 en ambas imágenes, no obstante el gran valor del algoritmo sigue siendo la objetividad, dejando a criterio del observador la toma de decisión con respecto a estas situaciones límite. Ya anteriormente mencioné que ICA entrega tres tipos de relaciones entre pixeles, ahora se entiende que esos artefactos de co-localización entre

pixeles 0 caen en el dominio de Ve-, este dominio de co-localización no entrega información valiosa al estudio de la co-localización entre las variantes de V2R, puesto que la señal de los fluoróforos es muy buena y fácilmente manejable aislada del *background*.

En un contexto particular, el análisis de una región de interés (ROI) permite discriminar de mejor forma aquellos pixeles que presentan dependencia entre las imágenes, además desde el punto de vista morfológico se enriquece el análisis de estructuras, sobretodo de algunas tan bien delimitadas como el aparato de Golgi o la membrana plasmática. Lo que se observa en la figura 6 panel II son dos ROIs tomadas de las mismas imágenes del panel I y sometidas a la co-localización por ICA, en este caso se pretende destacar dos células del mismo campo; una que presenta señal para ambos fluoróforos (CFP e YFP), denominada ROI 1 y otra que sólo muestra señal de CFP, denominada ROI 2. Para las dos situaciones se muestra el resultado de Ve+.





Células 3T3 co-transfectadas con las construcciones V2aCFP y V2bYFP fueron observadas por microscopía confocal con una C.A. de 110 µm, una magnificación de 60X y zoom 2. Panel I; se registraron imágenes de la señal de CFP (A) e YFP (B), ambas imágenes fueron procesadas para el análisis por ICA (D) y con las mismas se realizó una superposición de imágenes (C). Panel II; dos ROIs (destacadas con línea roja) fueron escogidas (métodos 3.2.5.2) de las imágenes A y B, para analizar sólo el dominio de pixeles Ve+. La barra de calibración de tamaño muestra 200 µm.

4.5 Co-localización de isoformas del receptor V2 con proteínas marcadoras de organelas celulares.

El siguiente paso de esta tesis, fue dilucidar hasta que punto de la vía secretora son capaces de alcanzar las isoformas del receptor V2 de vasopresina, expresadas individualmente sistemas heterólogos. En en esta etapa se transfectó independientemente y de forma pasajera 1 µg de los plasmidios conteniendo la construcción V2aCFP y V2bCFP, en células COS-7 que fueron privadas de SBF en el transcurso de las ultimas 24 horas antes de ser fijadas. Sobre estas células transfectadas y fijadas se realizó una IFI (métodos 3.2.2.3) utilizando el fluoróforo Alexa 633 conjugado al segundo anticuerpo para poder identificar el RE, ERGIC y aparato de Golgi.

En el microscopio confocal se buscó y registró el plano focal para cada organela, y este mismo plano fue utilizado para registrar la señal de las proteínas de fusión a CFP en la misma célula, luego ambas imágenes fueron sometidas al análisis de co-localización mediante el algoritmo ICA (Intensity Correlation Analisys, métodos 3.2.6.2.1). Esta co-localización se realizó sobre ROIs (regiones de interés) específicas, las que fueron escogidas utilizando el *plug-in* Multi cell outliner implementado en el *software* WCIF ImageJ, éste es un algoritmo morfológico que discrimina regiones de continuidad por diferencias de intensidad. Las ROIs escogidas circunscriben la distribución morfológica de cada uno de los marcadores de las organelas en estudio.

En la figura 7 se muestra la co-localización de las construcciones V2aCFP (panel I B, E y H) y V2bCFP (panel II B, E y H), con las proteínas marcadoras 58K (A

ambos paneles), Ergic-53 (D ambos paneles) y Calnexina (G ambos paneles) del aparato de Golgi, Ergic y RE respectivamente. En la imagen resultante de la co-localización (C, F, I, ambos paneles) sólo se muestran aquellos pixeles en los que la variación de intensidades es para ambas imágenes por sobre el promedio (Ve+). Las imágenes de colocalización se muestran pseudo-coloreadas con la *lut* Fire, aunque esto carece de sentido cuantitativo (mayor o menor co-localización) y sólo sirve para indicar las zonas con mayor concentración de ambos fluoróforos.

Tanto el receptor V2a como V2b co-localizan con el marcador de RE, y si bien esta estimación es netamente cualitativa, es interesante hacer notar que ambas isoformas son capaces de sortear el control de calidad del RE, puesto que también se observa colocalización con el marcador del compartimiento vesículo-tubular Ergic, indicando la presencia de proteína en tránsito más allá del RE. Finalmente, tanto V2a como V2b muestran co-localización con el marcador del aparato de Golgi, confirmando lo antes mencionado.





Fig 7.- Distribución de las variantes del Receptor V2 de vasopresina, en la vía secretora.

El receptor de vasopresina canónico V2a (panel I B, E y H) y la variante de empalme V2b (panel II B, E y H) fusionadas a la proteína CFP, se expresaron pasajeramente en células COS-7 privadas de SBF las últimas 24 horas de cultivo, paralelamente a estas células se les realizó una IFI con anticuerpos dirigidos contra las proteínas 58K, Ergic-53 y Calnexina, marcadoras del Aparato de Golgi (A, ambos paneles), ERGIC (D, ambos paneles) y Retículo Endoplásmico (G, ambos paneles) respectivamente. Tanto las imágenes de las proteínas de fusión como de las proteínas marcadoras de cada organela fueron registradas con una apertura confocal de 100µm, una magnificación de 60X y zoom 2. Para el análisis de co-localización (C, F e I, ambos paneles), se utilizó el método ICA sobre una región de interés, aislando la morfología de cada organela (línea en rojo, ver aumento en esquina inferior derecha para el aparato de Golgi y ERGIC) e indicando con una N el núcleo de la célula analizada.

4.6 Localización de la isoforma V2a en la membrana plasmática.

El hecho de que ambas proteínas (V2a y V2b), muestren co-localización con el marcador 58K del aparato de Golgi, indica claramente que estas son capaces de sortear el QCS del RE. La siguiente etapa de esta tesis, fue evaluar la llegada de estas proteínas a la Membrana Plasmática.

Para probar esta posibilidad se co-transfectaron pasajeramente células COS-7 con las construcciones V2aCFP y V2bYFP, en igual proporción. Las células fueron trabajadas en las condiciones ya establecidas de cultivo (24 horas de expresión SBF completo y 24 horas de privación de SBF).

En el microscopio confocal se registraron imágenes de la señal de CFP e YFP en una misma célula, este registro se realizó en un plano focal cercano a la base de la célula, intentando obtener todo el detalle morfológico de la membrana plasmática, para lo cual además se registró una imagen de Nomarski (Fig 8C), mostrando el relieve y morfología de dicha célula. Posteriormente las imágenes de CFP e YFP fueron sometidas al análisis de co-localización por ICA (Fig7 D). Sin embargo la señal de ambas proteínas es débil en las regiones que comprende la membrana plasmática; por esta razón, se realiza un ajuste de despliegue digital, el cual permite la observación de las zonas de bajas intensidades en la imagen. En la figura 8 se muestran las imágenes de CFP (A) e YFP (B) desplegadas de 0 a 300 en niveles de grises, esta técnica no implica una pérdida de información en la imagen, pues sólo dirige la observación hacia regiones pobres en señal saturando las altas intensidades. Con este tratamiento, es interesante hacer notar que aun las zonas de bajas intensidades contrastan muy bien, tanto de la señal de ruido de fondo, así como de la señal de auto-fluorescencia intrínseca de las células.

No obstante, lo más interesante no es la técnica utilizada para el análisis, sino más bien el resultado que arroja. Al observar la señal de V2aCFP, ésta se ajusta muy bien al perfil morfológico de la membrana plasmática en el Nomarski, no así la señal de la construcción V2bYFP, la cual permanece restringida hacia el citoplasma. Consecuentemente, el análisis de ICA muestra como las regiones no co-localizadas de ambas proteínas (V2aCFP y V2bYFP) están concentradas en el perímetro celular demarcado por el Nomarski.



Fig 8.- El receptor nativo V2a transita hasta la membrana plasmática, mientras que la variante de empalme V2b es retenida intracelularmente.

Células COS-7 fueron co-transfectadas en igual proporción con las construcciones V2aCFP (A) y V2bYFP (B), estas imágenes se presentan desplegadas de 0 a 300 en nivel de intensidad de la escala de grises, para observar regiones de baja intensidad. En rojo se destacan los núcleos con una letra N y las flechas indican el borde celular delimitado en el Nomarski (D). La co-localización por ICA (C), muestra en dorado los pixeles co-localizados y en azul los no co-localizados. Las imágenes fueron registradas en el microscopio confocal con una A.C. de 110µm, una magnificación de 60X y zoom

2.

4.7 NFRET entre oligómeros del receptor V2 de vasopresina.

La oligomerización de GPCRs es un concepto relativamente nuevo que poco a poco ha ido ganando aceptación, con importantes implicancias funcionales y ontogénicas para tales proteínas. Varios estudios han demostrado que la oligomerización es un evento temprano durante la biosíntesis de GPCRs, sugiriendo que tiene un papel primario en la maduración de estas proteínas (Issafras *et al.* 2002; Overton and Blumer 2002; Floyd *et al.* 2003; Terrillon *et al.* 2003). Además, en algunos casos se ha demostrado que la oligomerización es necesaria para la expresión funcional en superficie celular de estas proteínas, como es el caso del receptor del ácido metabotrópico γ -aminobutírico (GbR) (Margeta-Mitrovic *et al.* 2000). También se ha demostrado que el acoplamiento a proteína G, señalización intracelular y procesos regulatorios como la internalización del receptor, pueden ser influenciados por la naturaleza dimérica de los receptores.

Con el objeto de evaluar la formación de las tres posibles situaciones de oligomerización para V2R, células COS-7 fueron transfectadas con pares de las isoformas del receptor V2, como proteínas de fusión a CFP y/o YFP (V2aCFP + V2aYFP, V2bCFP + V2bYFP y V2aCFP + V2bYFP). De estas co-transfecciones se colectaron imágenes en el microscopio confocal, con una A.C. de 110 µm, para medir la transferencia de energía por el método de los tres filtros (Gordon, *et al.* 1998) normalizada por la raíz cuadrada de la señal del dador por el aceptor (Xia and Liu 2001), abreviada NFRET.

En estas condiciones sólo es posible observar NFRET, si de las isoformas que oligomerizan una posee el fluoróforo CFP y la otra YFP. El nivel de NFRET observado fue contrastado con la misma medición hecha en células COS-7 transfectadas con el par de fluoróforos CFP + YFP, estas dos proteínas solubles permiten discriminar cuando la transferencia de energía se debe a colisiones aleatorias producidas entre el par de fluoróforos. Como se observa en la figura 9 panel I, medido en un despliegue de intensidad de 0 - 20, el NFRET es mucho mayor en las condiciones de formación de oligómeros del receptor V2, que el calculado para las proteínas solubles.

Este resultado indica que las interacciones producidas entre las proteínas quiméricas son de una naturaleza distinta de las ocurridas con las proteínas solubles, y que probablemente corresponde a la oligomerización de los receptores.

Si bien la línea celular COS-7 es presentada en esta tesis como un sistema de sobreexpresión de proteínas, con el fin de constatar que esta condición no influencia la determinación, se realizó la misma aproximación experimental para el cálculo de NFRET en la línea celular 3T3 (fig. 9 panel II), la cual no expresa el antígeno T grande.

En células 3T3 es posible detectar, al igual que en COS-7, transferencia de energía en un nivel que va de 15 a 20, demostrando lo robusto e independiente que es el resultado en relación al nivel de expresión de proteínas.




Fig 9.- NFRET calculado para las tres situaciones de oligomerización del receptor V2 de Vasopresina.

Células COS-7 (panel I) y 3T3 (panel II) fueron co-transfectadas con las isoformas del receptor V2 de vasopresina como proteínas de fusión a CFP y/o YFP, en combinaciones que permiten la conformación de las tres situaciones de holigomerización, además de Células COS-7 co-expresando las proteínas solubles CFP e YFP;

- i) V2aCFP-V2aYFP,
- *ii)* V2aCFP-V2bYFP y
- *iii)* V2bCFP-V2bYFP;
- *iiii)* CFP + YFP (control negativo).

En la figura se muestra la imagen resultante del FRET Normalizado (NFRET), calculado mediante el método de los tres set de filtros; canal Dador (D) en *Cyan*, canal Aceptor (A) en Amarillo y canal Fret (F) en verde, las imágenes fueron tomadas con una A.C. de 110nm, una magnificación de 60X y zoom 2; NFRET está pseudo coloreada con la *lut* Fire, desplegada en todos los casos de 0 a 20 (para cada imagen se muestra la barra de despliegue en la esquina superior derecha), con el objeto de comparar entre las distintas situaciones presentadas.

4.8 Oligómeros del receptor V2 son detectados a nivel del RE y alcanzan el aparato de Golgi.

Para el receptor de vasopresina V2, se ha descrito la formación de oligómeros en el RE (Terrillon, *et al.* 2003), indicando que este es un evento que ocurre tempranamente, durante la síntesis del receptor. Sin embargo poco es lo que se sabe acerca de la distribución intracelular de estas formas oligoméricas, y el alcance que estas tienen en su tránsito por la vía secretora. Con el ánimo de resolver esta interrogante, se recurrió al cálculo de la transferencia de energía en células COS-7, y posterior co-localización de la imagen NFRET con las distintas proteínas marcadoras de organelas en la vía secretora (Fig 10).

En células COS-7 se realizaron las siguientes co-transfecciones pasajeras: V2aCFP + V2aYFP (Fig. 10 panel I), V2aCFP + V2bYFP (Fig. 10 panel II) y V2bCFP + V2bYFP (Fig. 10 panel III); estas células fueron privadas de SBF durante las últimas 24 horas de cultivo, posterior a ésto fueron fijadas y se realizó IFI contra las proteínas marcadoras Calnexina (Fig. 10 A, tres paneles), Ergic-53 (Fig. 10 B, tres paneles) y 58K (Fig. 10 C, tres paneles) del RE, ERGIC y aparato de Golgi respectivamente.

En cada célula de la preparación, las proteínas marcadoras de organelas están distribuidas en el volumen que delimita las estructuras de las que forman parte, por esta razón, en el microscopio confocal se registró un plano focal para cada campo observado, utilizando la señal de la IFI como referencia (A. C. de 110µm), y sobre ese mismo plano se registró el set de tres filtros necesarios para el cálculo de la transferencia de energía. Esta estrategia de captura implica un criterio de búsqueda,

dirigido a encontrar el plano focal que muestre la mejor distribución del marcador de la organela, y sólo en ese plano observar el NFRET; este criterio se apoya en la lógica de observar la presencia de los oligómeros sólo en la región circunscrita por los marcadores.

Las imágenes muestran para las tres situaciones de oligomerización, una fuerte co-localización del NFRET con el marcador de RE, confirmando la temprana formación de éstos. Además se puede observar co-localización con el marcador de ERGIC, indicando la existencia de formas oligoméricas en transito entre el RE y el aparato de Golgi. Consecuentemente, también es posible observar una pequeña región de la imagen NFRET que co-localiza con el marcador del aparato de Golgi.







Células Cos-7 fueron co-transfectadas con las variantes de V2R fusionadas a CFP e YFP, en combinaciones que permitan la observación de la transferencia de energía para las tres situaciones de oligomerización: V2a.V2a, V2a.V2b y V2b.V2b (NFRET en tres paneles). Mediante microscopia confocal con una AC de 110µm, una magnificación de 60X y zoom 2, se registro un plano de las IFIs (imágenes en verde), dirigidas contra la proteína Calnexina (A) del RE, Ergic-53 (B) del compartimiento vesículo-tubular ERGIC y 58K-9 (C) del aparato de Golgi; además sobre el mismo plano focal se registraron las respectivas imágenes para realizar el cálculo de NFRET (imágenes fondo azul). Finalmente la imagen NFRET resultante fue co-localizada con la imagen correspondiente de la organela, usando el algoritmo ICA sobre una ROI destacada en rojo y mostrando sólo aquellos pixeles que co-localizan por sobre los promedios de cada imagen (Ve+), en algunas imágenes se muestra una ventana de aumento en la esquina inferior derecha. La barra de tamaño se muestra para cada imagen en la esquina superior derecha y el núcleo de la célula analizada está marcado con una N.

5 DISCUSION

Tanto el receptor de vasopresina nativo del riñón de Rata V2a como la variante de empalme alternativo V2b fueron expresados en sistemas heterólogos (COS-7 y 3T3), modelos biológicos que por no ser especie-específicos, paradójicamente caen en la categoría de in Vitro, en estas condiciones el perfil de distribución intracelular de ambas proteínas es muy heterogéneo dentro de la población, con cierta predominancia de un perfil de tipo reticular y de otro yuxtanuclear (Fig. 3). La variabilidad observada en el perfil de distribución de estas proteínas podría estar explicada en parte por una falta de sincronía en la población de células.

Ya se ha observado que el aparato de Golgi es una estructura dinámica; durante la mitosis éste sufre una desestructuración, fusionándose con las membranas del RE y reorganizándose hacia el final de la división celular (Zaal *et al.* 1999). Teniendo en cuenta esto último, para lograr entender y obtener información de la distribución de ambas formas del receptor V2 a través de la vía secretora de proteínas, en el estado estacionario y basándose en co-localización con marcadores de organelas de la vía secretora, se hizo indispensable estabilizar dichas organelas en el contexto del ciclo celular, bajo un criterio estrictamente morfológico y en el sentido práctico de facilitar su discriminación, previo al análisis de co-localización por imágenes. En tal sentido, se optó por una estrategia previamente descrita para sincronizar el ciclo celular en la etapa de G₀ (Kues, *et al.* 2000), y debido a que esta etapa del ciclo muestra una clara distribución del RE y del aparato de Golgi, se recurrió a la observación de la distribución de la distribución del marcador de esta última organela, para controlar su efecto. El efecto observado sobre esta organela en células 3T3 y COS-7 fue drástico, la señal

fluorescencia para el marcador del aparato de Golgi, al privar de suero, se reúne completamente hacia una región que es yuxtanuclear, entregando un perfil morfológico de fácil manejo e interpretación en el posterior análisis de las imágenes.

La herramienta de co-localización ICA, a pesar de tener el potencial para entregar información cuantitativa, sólo fue utilizada a un nivel cualitativo. No obstante, las configuraciones de los caminos ópticos utilizados en el microscopio confocal fueron las apropiadas, permitiendo una buena separación de los espectros de emisión de las señales de ambos fluoróforos, además de la excelente relación señal/fondo obtenida con los fluoróforos utilizados y por último la estrategia de trabajar con ROIs y considerar sólo los valores Ve+ en la co-localización, con un resultado negativo para regiones que muestran presencia de un sólo fluoróforo y positivo cuando ambos fluoróforos están en proporciones relativamente iguales; claramente indican que el método de ICA entrega una aproximación mucho más objetiva que el ya clásico método de superposición de imágenes. Ésto es en gran medida concordante con el objetivo requerido en esta tesis, de entender el tránsito y los sitios de retención de las dos isoformas del receptor de vasopresina.

El receptor de vasopresina pertenece a la familia de receptores de siete dominios de transmembrana acoplados a la proteína hétero-trimérica G (GPCR), y como cualquier proteína integral de membrana alcanza su destino final luego de haber transitado a través de la vía secretora. El transporte intracelular de proteínas de membrana se inicia con su integración en la membrana del RE, cuando los ribosomas involucrados en su síntesis se unen al RE y la cadena naciente es integrada en la membrana a medida que la síntesis progresa. Durante la inserción en la membrana del RE se determina la topología

de estas proteínas. A su vez, las proteínas de membrana durante este proceso se pliegan y su estado de plegamiento es verificado por el sistema de control de calidad (QCS). Gracias al mecanismo de control de calidad sólo proteínas correctamente plegadas abandonan el RE. Formas mal plegadas o incompletamente plegadas son retenidas en el RE y finalmente son sometidas a degradación asociada al RE (ERAD), un proceso que incluye translocación retrógrada hacia el citoplasma, ubiquitinación y degradación por el proteosoma (Bonifacino and Weissman 1998).

En la porción luminal del RE, el plegamiento de proteínas de membrana es asistido por diferentes chaperonas moleculares. Además, éstas juegan un rol importante en el QCS del RE. Chaperonas "clásicas" se unen a proteínas no-plegadas. En este grupo se encuentran las proteínas reguladas por glucosa GRP78 (ó BIP), GRP94 y GRP170 (Gething 1999). Chaperonas "no clásicas" juegan un rol importante en el proceso de plegamiento de proteínas que contienen N-glicosilaciones. Chaperonas de este tipo son Calnexina (CNX) y Calreticulina (CRT), componentes claves del ciclo de CNX-CRT (Trombetta and Helenius 1998; Parodi 2000).

Algunas proteínas mal plegadas alcanzan el ERGIC, en donde ellas son reconocidas y destinadas al sistema de transporte retrógrado (Hermosilla *et al.* 2004). El ERGIC por lo tanto, no es sólo una estación de destinación de proteínas en su tráfico al aparato de Golgi, (transporte anterógrado), sino que, además, las proteínas de la vía secretoria pueden ser enviadas, por transporte retrógrado, de vuelta al RE y retenidas en este compartimiento (Aridor *et al.* 1995; Hauri *et al.* 2000; Klumperman 2000). Este transporte retrógrado es mediado por vesículas recubiertas por COP I. A modo de ejemplo, numerosas mutantes del receptor V2 humano causantes de Diabetes Insípida

Nefrogénica ligada al cromosoma X, son retenidas en el intracelular por el sistema de control de calidad. De estas mutantes, en particular R337X, truncada al residuo arginina 337, se ha demostrado que alcanza el ERGIC y desde éste la proteína es transportada en forma retrógrada al ER (Hermosilla *et al.* 2004).

Tanto la proteína V2a como la variante de empalme V2b co-localizan con el marcador de RE, pero también se observa co-localización con los marcadores de ERGIC y aparato Golgi, en ambos tipos celulares. Además, en una co-transfección de V2aCFP + V2bYFP, en la que se realizó un análisis de co-localización global por ICA y apoyado en una imagen de Nomarski, para lograr discriminar la membrana plasmática, se logró establecer que sólo el receptor V2a es detectado a nivel de la Membrana Plasmática. Esto último parece indicar que, si bien las dos proteínas son detectadas en su tránsito por la vía secretora, y ambas están expuestas al QCS del RE y al mecanismo de transporte retrógrado del ERGIC, sólo el receptor canónico logra escapar del aparato de Golgi y transitar normalmente hacia la membrana plasmática, mientras que la variante de empalme es retenida intracelularmente.

Los GPCR son capaces de formar homo y hétero-oligómeros entre subtipos de receptores relacionados. Aunque su biosíntesis y transporte a través de la vía secretora está pobremente caracterizada, la salida del RE ha mostrado ser un paso crucial para su expresión en la membrana plasmática (Petaja-Repo *et al.* 2000). Para muchas proteínas el ensamblaje oligomérico tiene importantes implicancias en el reconocimiento por el QCS, debido a que éste enmascara señales de retención específicas o parches hidrofóbicos que de estar expuestos mantendría retenidas las proteínas retenidas en el RE (Reddy and Corley 1998).

Para los GPCR, la necesidad de oligomerización para el correcto tráfico hacia la membrana plasmática ha sido claramente mostrada en el receptor del ácido metabotrópico γ-aminobutírico (GbR), el cual está compuesto por dos subunidades, GbR1 y GbR2 (Marshall *et al.* 1999). Cuando éstas se expresan por si solas, GbR1 es retenido intracelularmente como proteína inmadura por poseer un motivo de retención en RE hacia el c-terminal (Margeta-Mitrovic *et al.* 2000), mientras que GbR2 alcanza la membrana plasmática pero no es funcional. Cuando GbR1 es co-expresado con GbR2, la hétero-dimerización enmascara la señal de retención de GbR1 y permite la llegada del hétero-dímero funcional a la membrana plasmática. Por último, cabe mencionar que existen varios estudios que muestran GPCRs oligomerizando tempranamente en el RE (Issafras *et al.* 2002; Overton and Blumer 2002; Floyd *et al.* 2003; Terrillon *et al.* 2003).

La Transferencia de Energía Fluorescente de Resonancia (FRET), es una técnica usada para cuantificar la distancia relativa entre dos fluoróforos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para determinar la formación de oligómeros. Existen variados métodos para calcular FRET. En esta tesis en particular, se utilizó el método de los tres set de filtros (Gordon *et al.* 1998), normalizando (NFRET) con respecto a las señales del dador (CFP) y el aceptor (YFP) (Xia and Liu 2001).

Respecto de lo anterior, para el receptor V2 de rata estudiado en esta tesis, se detectó transferencia de energía (FRET), cuando se co-transfectaron las dos variantes del receptor en las tres combinaciones posibles de oligómeros (Fig. 9), como proteínas de fusión al par de fluoróforos compatibles para FRET, CFP e YFP. Al comparar el nivel de FRET entre el modelo de sobre-expresión (COS-7) con respecto al modelo control (3T3), independientemente del nivel de expresión de proteínas que pudiese

existir, el índice NFRET (FRET Normalizado) muestra para ambos modelos un nivel cercano a 20, el cual contrasta con el control negativo (CFP + YFP), que no supera el nivel de 10. Esto último, indica que la transferencia de energía detectada para las tres situaciones de oligomerización, es de naturaleza distinta a la que ocurre por colisiones al azar (como ocurre en CFP + YFP) entre fluoróforos; por el contrario, la transferencia de energía depende en gran medida de la distancia molecular existente entre los fluoróforos, lo que nos lleva a pensar que el NFRET detectado, evidencia una cercanía íntima molecular condicionada por la oligomerización entre las isoformas del receptor V2.

Interesantemente, como muestran los experimentos de co-localización de la señal NFRET con los marcadores de la vía secretora (Fig. 10), tanto el hétero-oligómero V2a.V2b, así como los dos homo-oligómeros, V2a.V2a y V2b.V2b, muestran co-localización con el marcador del RE, evidenciando su temprana formación a nivel de esta organela. También se detectó co-localización de NFRET con el marcador de ERGIC y con el marcador del aparato de Golgi, evidenciando que estas formas oligoméricas son capaces de escapar del QCS en el RE y que se encuentran en la ruta de transporte anterógrado hacia el aparato de Golgi. Considerando este resultado y contrastándolo con lo observado en la figura 8, en la cual se muestra una co-transfección de V2aCFP + V2bYFP, en donde sólo se detecta señal de CFP en regiones que corresponden a la membrana plasmática; se puede plantear la hipótesis de que sólo el homo-oligómero V2aCFP.V2aYFP logra transitar desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática. Sin embargo, la principal dificultad encontrada al tratar de demostrar esto, por medio de las técnicas de imagen desarrolladas en esta tesis, ha sido la escasa proporción de esta proteína que alcanza la membrana plasmática, en los

modelos celulares utilizados. Por ello, para probar esta hipótesis, será necesario demostrar la presencia del homo-oligómero V2a.V2a en la membrana plasmática, pero en un modelo celular de tipo epitelial (células MDCK, por ejemplo), ya que este tipo celular condiciona el tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática basolateral, lo cual permitiría, por ejemplo, calcular FRET (para el homo-oligómero V2a.V2a) en esta organela.

No obstante, el experimento ilustrado en la figura 8, implica la posibilidad de que se forme tanto el hétero-oligómero V2aCFP.V2bYFP, como los dos homooligómeros V2aCFP.V2aCFP y V2bYFP.V2bYFP, pero no se detecta señal de la proteína fluorescente YFP a nivel de la membrana plasmática, por lo que sí es posible asegurar que ninguna de estas formas oligoméricas en las que participe la variante de empalme logra transitar desde el aparato de Golgi hasta la superficie celular. Este interesante hallazgo, concuerda con el mecanismo de regulación negativa, ejercido por la variante de empalme, propuesto para este receptor (Sarmiento *et al.* 2004).

6 CONCLUSIONES

Por co-expresión en modelos heterólogos, mediante el cálculo del índice NFRET se detecta la formación del hétero-dímero y los dos homo-dímeros, entre las isoformas V2a y V2b del receptor de vasopresina V2 de rata.

Mediante co-localización de la señal NFRET con marcadores de organelas celulares, se determinó que la formación de estas formas oligómericas tiene lugar tempranamente en el RE, sin embargo también se localizan en el ERGIC y el aparato de Golgi.

Sólo el receptor V2a logra ser detectado en la membrana plasmática, no así la variante de empalme V2b, la cual queda retenida intracelularmente. Ésto fue demostrado por microscopía de fluorescencia confocal, en una co-transfección de ambas proteínas en sistemas heterólogos y tomando como referencia de la membrana plasmática una imagen de Nomarski. Sin embargo aún no se ha determinado la presencia de oligómeros en la superficie celular.

Oligómeros del receptor V2 de vasopresina de Rata en los que participe la variante de empalme V2b, quedan retenidos intracelularmente, logrando ser detectados en RE, ERGIC y aparato de Golgi.

7 BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B. (2002). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.

- Aridor, M., Bannykh, S. I., Rowe, T. and Balch, W. E. (1995). "Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport." <u>J Cell Biol</u> 131(4): 875-93.
- Benkirane, M., Jin, D. Y., Chun, R. F., Koup, R. A. and Jeang, K. T. (1997). "Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32." <u>J Biol Chem</u> 272(49): 30603-6.
- Birnbaumer, M. (1999). "Vasopressin receptor mutations and nephrogenic diabetes insipidus." <u>Arch Med Res</u> 30(6): 465-74.
- Birnbaumer, M. (2000). "Vasopressin receptors." <u>Trends Endocrinol Metab</u> **11**(10): 406-10.
- Bloom, G. S. and Brashear, T. A. (1989). "A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules." J Biol Chem **264**(27): 16083-92.
- Bonifacino, J. S. and Weissman, A. M. (1998). "Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> **14**: 19-57.
- Bouvier, M. (2001). "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." <u>Nat</u> <u>Rev Neurosci</u> **2**(4): 274-86.
- Cao, T. T., Deacon, H. W., Reczek, D., Bretscher, A. and von Zastrow, M. (1999). "A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor." Nature 401(6750): 286-90.
- Colley, N. J., Cassill, J. A., Baker, E. K. and Zuker, C. S. (1995). "Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **92**(7): 3070-4.

- Feige, J. N., Sage, D., Wahli, W., Desvergne, B. and Gelman, L. (2005). "PixFRET, an ImageJ plug-in for FRET calculation that can accommodate variations in spectral bleed-throughs." <u>Microsc Res Tech</u> 68(1): 51-8.
- Ferguson, D. R. and Heller, H. (1965). "Distribution of neurohypophysial hormones in mammals." <u>J Physiol</u> 180(4): 846-63.
- Firsov, D., Mandon, B., Morel, A., Merot, J., Le Maout, S., Bellanger, A. C., de Rouffignac, C., Elalouf, J. M. and Buhler, J. M. (1994). "Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nephron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor." <u>Pflugers Arch</u> 429(1): 79-89.
- Floyd, D. H., Geva, A., Bruinsma, S. P., Overton, M. C., Blumer, K. J. and Baranski, T. J. (2003). "C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast." J <u>Biol Chem</u> 278(37): 35354-61.
- Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prezeau, L. and Pin, J. P. (2001). "Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function." <u>Embo J</u> 20(9): 2152-9.
- Gething, M. J. (1999). "Role and regulation of the ER chaperone BiP." <u>Semin Cell Dev</u> <u>Biol</u> **10**(5): 465-72.
- Gilinger, G. and Alwine, J. C. (1993). "Transcriptional activation by simian virus 40 large T antigen: requirements for simple promoter structures containing either TATA or initiator elements with variable upstream factor binding sites." J Virol 67(11): 6682-8.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." <u>Cell</u> **23**(1): 175-82.

- Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B. and Herman, B. (1998).
 "Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy." <u>Biophys J</u> 74(5): 2702-13.
- Grosse, R., Schoneberg, T., Schultz, G. and Gudermann, T. (1997). "Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor." <u>Mol Endocrinol</u> 11(9): 1305-18.
- Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H. and Appenzeller, C. (2000). "ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway." <u>J Cell Sci</u> 113 (Pt 4): 587-96.
- Hermosilla, R., Oueslati, M., Donalies, U., Schonenberger, E., Krause, E., Oksche, A., Rosenthal, W. and Schulein, R. (2004). "Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway." <u>Traffic</u> 5(12): 993-1005.
- Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M. and Marullo, S. (2002). "Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors." <u>J Biol Chem</u> 277(38): 34666-73.
- Jordan, B. A. and Devi, L. A. (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." <u>Nature</u> **399**(6737): 697-700.
- Jordan, B. A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R. and Devi, L. A. (2001). "Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation." <u>Proc Natl Acad Sci</u> U S A 98(1): 343-8.
- Karpa, K. D., Lin, R., Kabbani, N. and Levenson, R. (2000). "The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf

interaction causes mislocalization of D3 receptors." <u>Mol Pharmacol</u> **58**(4): 677-83.

- Klumperman, J. (2000). "Transport between ER and Golgi." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **12**(4): 445-9.
- Klussmann, E., Maric, K. and Rosenthal, W. (2000). "The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct." <u>Rev Physiol Biochem Pharmacol</u> 141: 33-95.
- Kues, W. A., Anger, M., Carnwath, J. W., Paul, D., Motlik, J. and Niemann, H. (2000).
 "Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors." <u>Biol Reprod</u> 62(2): 412-9.
- Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L. R., Zhu, W. Z., Xiao, R. P., Lakatta, E. G., Bouvier, M. and Hebert, T. E. (2002).
 "Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy." J Biol Chem 277(38): 35402-10.
- Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B. and Stanley, E. F. (2004). "A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization." <u>J Neurosci</u> 24(16): 4070-81.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2000). "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization." Neuron **27**(1): 97-106.
- Marshall, F. H., White, J., Main, M., Green, A. and Wise, A. (1999). "GABA(B) receptors function as heterodimers." <u>Biochem Soc Trans</u> **27**(4): 530-5.
- Moens, U., Van Ghelue, M., Kristoffersen, A. K., Johansen, B., Rekvig, O. P., Degre, M. and Rollag, H. (2001). "Simian virus 40 large T-antigen, but not small T-

antigen, trans-activates the human cytomegalovirus major immediate early promoter." <u>Virus Genes</u> **23**(2): 215-26.

- Morel, A., Lolait, S. J. and Brownstein, M. J. (1993). "Molecular cloning and expression of rat V1a and V2 arginine vasopressin receptors." <u>Regul Pept</u> 45(1-2): 53-9.
- Nielsen, S., Chou, C. L., Marples, D., Christensen, E. I., Kishore, B. K. and Knepper, M. A. (1995). "Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 92(4): 1013-7.
- Overton, M. C. and Blumer, K. J. (2002). "Use of fluorescence resonance energy transfer to analyze oligomerization of G-protein-coupled receptors expressed in yeast." <u>Methods</u> **27**(4): 324-32.
- Parodi, A. J. (2000). "Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation." <u>Biochem J</u> 348 Pt 1: 1-13.
- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P. and Bouvier, M. (2001). "Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome." J Biol Chem 276(6): 4416-23.
- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P. and Bouvier, M. (2000).
 "Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor." J Biol Chem 275(18): 13727-36.
- Premont, R. T., Inglese, J. and Lefkowitz, R. J. (1995). "Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors." <u>Faseb J</u> 9(2): 175-82.

- Reddy, P. S. and Corley, R. B. (1998). "Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum." <u>Bioessays</u> 20(7): 546-54.
- Saito, M., Sugimoto, T., Tahara, A. and Kawashima, H. (1995). "Molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor: evidence for its expression in extra-pituitary tissues." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 212(3): 751-7.
- Sarmiento, J. M., Anazco, C. C., Campos, D. M., Prado, G. N., Navarro, J. and Gonzalez, C. B. (2004). "Novel down-regulatory mechanism of the surface expression of the vasopressin V2 receptor by an alternative splice receptor variant." <u>J Biol Chem</u> 279(45): 47017-23.
- Seibold, A., Brabet, P., Rosenthal, W. and Birnbaumer, M. (1992). "Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gene." <u>Am J Hum Genet</u> 51(5): 1078-83.
- Shioda, T., Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y. and Iwamoto, A. (2001). "Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CCR5." J Virol 75(7): 3462-8.
- Terrillon, S., Barberis, C. and Bouvier, M. (2004). "Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 101(6): 1548-53.
- Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M. A., Taulan, M., Jockers, R., Barberis, C. and Bouvier, M. (2003). "Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis." <u>Mol Endocrinol</u> 17(4): 677-91.

Thibonnier, M. (1988). "Vasopressin and blood pressure." Kidney Int Suppl 25: S52-6.

- Thibonnier, M., Coles, P., Thibonnier, A. and Shoham, M. (2001). "The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists." <u>Annu Rev Pharmacol Toxicol</u> 41: 175-202.
- Trombetta, E. S. and Helenius, A. (1998). "Lectins as chaperones in glycoprotein folding." <u>Curr Opin Struct Biol</u> **8**(5): 587-92.
- Wang, Q. and Limbird, L. E. (2002). "Regulated interactions of the alpha 2A adrenergic receptor with spinophilin, 14-3-3zeta, and arrestin 3." J Biol Chem 277(52): 50589-96.
- Wess, J. (1998). "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity." <u>Pharmacol Ther</u> 80(3): 231-64.
- 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." <u>Nature</u> 396(6712): 679-82.
- Wu, G., Benovic, J. L., Hildebrandt, J. D. and Lanier, S. M. (1998). "Receptor docking sites for G-protein betagamma subunits. Implications for signal regulation." J
 <u>Biol Chem</u> 273(13): 7197-200.
- Xia, Z. and Liu, Y. (2001). "Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes." <u>Biophys J 81(4)</u>: 2395-402.
- Zaal, K. J., Smith, C. L., Polishchuk, R. S., Altan, N., Cole, N. B., Ellenberg, J., Hirschberg, K., Presley, J. F., Roberts, T. H., Siggia, E., Phair, R. D. and Lippincott-Schwartz, J. (1999). "Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis." <u>Cell</u> 99(6): 589-601.
- Zhu, X. and Wess, J. (1998). "Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function." <u>Biochemistry</u> 37(45): 15773-84.