



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS RECEPTORES P2Y4 Y P2Y11 DE *Xenopus laevis* ACOPLADOS A PROTEÍNAS FLUORESCENTES

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

YUTSIL ANDREA LEYVA PÉREZ

TUTORES PRINCIPALES:

Dr. ROGELIO ARELLANO OSTOA (INB, UNAM)

Dra. TERESA EDITH GARAY ROJAS (INB, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ (INB, UNAM)

Dr. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES (INB, UNAM)

QUERÉTARO, FEBRERO 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Yutsil Andrea Leyva Pérez, cuyo título es: “Expresión Heteróloga de los Receptores P2Y4 y P2Y11 de *Xenopus laevis* Acoplados a Proteínas Fluorescentes” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo _____

Secretario (Tutor)

Dr. Rogelio Arellano Ostoa _____

Vocal

Dra. Laura Cristina Berumen Segura _____

Suplente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz _____

Suplente

Dra. Aurea Orozco Rivas _____

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Instituto de Neurobiología de la UNAM por la formación que me fue brindada durante mis estudios de Maestría en Ciencias (Neurobiología).

Agradezco a mis tutores, el Dr. Rogelio Arellano Ostoia y la Dra. Teresa Edith Garay Rojas por su valioso tiempo, consejos y apoyo durante mis estudios de maestría y realización de esta Tesis.

A los miembros de mi Comité Tutor, el Dr. Mauricio Díaz Muñoz y el Dr. Ataúlfo Martínez Torres por sus acertados comentarios y aportaciones durante mi formación en la maestría.

A los miembros del jurado de Examen de Grado: el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, el Dr. Mauricio Díaz Muñoz y la Dra. Aurea Orozco Rivas por sus valiosas aportaciones durante la revisión del presente trabajo.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico por la orientación y eficiente ayuda prestada durante todos los trámites académicos y administrativos.

A la M. en C. Adriana González Gallardo y a la Dra. Anaid Antaramian Salas, responsables de la Unidad de Proteogenómica, por el apoyo brindado para el uso de material biológico.

A la Ing. Nydia Hernández Ríos, a cargo de la Unidad de Microscopía, por su gran ayuda en la adquisición y procesamiento de las imágenes obtenidas para este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (becaria No. 368264) así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No. 9917325-0) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este trabajo.

A mis padres:

Inés Graciela y Cupertino, porque mis raíces me hicieron valiente y firme.

A mis hermanos:

Iziltzi Juliana y Nisin Alonso, cómplices de mi identidad.

A mis amigas y compañeras:

Karla, Lety, Cris, Sofy, Yec, Dani, Gina, Eli y Angélica, porque siempre es mejor acumular momentos hermosos que cosas materiales.

A mi familia:

Porque en donde ellos estén, tengo mi hogar.

A Marisol, Don Raúl, Sandy y Aldo: por compartir parte de su vida conmigo y aceptarme en su familia, los quiero mucho.

A mi Raúl:

Porque mi camino ha sido justo y al fin te he conocido, porque presenciar el nacimiento de la existencia es aún más trascendente cuando se tiene un testigo de vida. Gracias amor mío, por tomar mi mano y ser mi testigo construyendo un terreno aún más firme bajo mis pies.
¡Te amo por todo lo que eres!

Por supuesto a mi alma mater:

¡la UNAM!

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY.....	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. EL FOLÍCULO DE XENOPUS LAEVIS.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	17
6.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	17
6.2. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA	17
6.3. DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS	18
6.4. DEFOSFORILACIÓN.....	18
6.5. LIGACIÓN	19
6.6. TRANSFORMACIONES	19
6.7. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	19
6.8. TRANSFECCIÓN	20
6.9. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE CÉLULAS TRANSFECTADAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	21
6.10. FIJACIÓN DE CÉLULAS	21
6.11. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS	22
6.12. MICROSCOPIA CONFOCAL	23
7. RESULTADOS.....	23
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIÓN	38

FIGURAS.....	39
10. REFERENCIAS.....	40

RESUMEN

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés), interactúan con una gran variedad de proteínas membranales y citoplásmicas así como con otros GPCRs. Dichas interacciones son de crucial importancia dado que determinan las propiedades farmacológicas y funcionales del receptor. Dentro de los GPCRs se encuentran los que unen ATP y a los que se les ha denominado receptores purinérgicos P2Y.

La estimulación de receptores purinérgicos en el ovocito de *Xenopus laevis*, genera corrientes acarreadas por Cl^- , entre éstas la F_{Cl} , que podría ser generada por la participación de dos receptores P2Y. Una hipótesis de nuestro laboratorio propone que los receptores P2Y11 y P2Y4 podrían estar implicados ya que al ser coexpresados heterológamente en la membrana del ovocito, muestran cambios en su selectividad por los agonistas, similar a lo observado al generarse la F_{Cl} . Lo anterior puede ser explicado por el hecho de que los receptores constituyan heterómeros con propiedades diferentes.

Como un acercamiento para tratar de demostrar una interacción física estrecha y una segregación con posibles efectos funcionales se decidió construir una proteína quimérica del receptor P2Y11 y la proteína fluorescente roja (P2Y11-RFP) y coexpresarla con la proteína de fusión P2Y4-GFP en la línea celular 1321N1 y analizar por microscopía confocal la localización de estos receptores.

Los resultados obtenidos muestran una relocalización de ambas proteínas cuando son coexpresadas, además de cierto grado de colocación entre ellas en comparación con lo observado cuando las proteínas se expresan de forma independiente. Es sugerente que podría existir una modulación entre ambas proteínas y que ésta podría ser de tipo funcional.

SUMMARY

The G protein-coupled receptors or GPCRs interact with a number of membrane and cytoplasmic proteins as well as with others GPCRs. Such interactions are very important because they determine the pharmacological and functional properties of the receptors. The GPCRs whose ligand is ATP are termed P2Y and named purine receptors.

Stimulation of the purine receptors in the *Xenopus laevis* oocyte generates Cl⁻ currents such as F_{Cl} that could be generated by the participation of two P2Y receptors. A hypothesis in our laboratory proposes that the P2Y11 and P2Y4 receptors might be implicated in this electrical response, because when the receptors were heterologously coexpressed in the oocyte membrane responses elicited by agonists showed changes in their potency similar to that observed when the F_{Cl} current is generated. This might be explained if the P2Y4 and PY11 can form heteromeric receptors with different properties.

As a first approach to demonstrate our hypothesis we decided to build a fusion protein of the P2Y11 receptor and the red fluorescent protein (P2Y11-DsRed) and co-express it with the fusion protein P2Y4-GFP in the 1321N1 cellular line and to analyze the localization of these receptors through confocal microscopy.

These results clearly show a relocalization of both proteins when they are co-expressed, and also a certain percentage of relocalization among them, compared with that observed when the proteins are expressed independently. Thus, there exists some type of interaction between both proteins that might affect their functio

1. INTRODUCCIÓN

La comunicación celular es la capacidad que tienen todas las células de intercambiar información fisicoquímica con otras células y con el medio que las rodea. Esta comunicación les permite a los organismos mantener un correcto estado de homeostasis. En los organismos multicelulares la sobrevivencia depende de una compleja red de comunicación en donde se coordina el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo celular (Carriba, 2007).

Esta comunicación puede ocurrir a través de moléculas señal o ligandos de diversa naturaleza química tales como proteínas, péptidos pequeños, aminoácidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos e incluso gases como óxido nítrico y monóxido de carbono que se unen a moléculas específicas en la superficie celular conocidas como receptores. La mayor parte de estos ligandos son secretados desde la célula al espacio extracelular a través del proceso de exocitosis, otras son liberadas por difusión a través de la membrana plasmática y algunas son expuestas al medio extracelular mientras permanecen ancladas a la membrana plasmática (Carriba, 2007).

Típicamente los ligandos actúan a concentraciones bajas y los receptores que las reconocen generalmente lo hacen con alta afinidad. La forma en que la célula responde a diversos estímulos varía dependiendo de los receptores que posee lo cual determina el conjunto de señales que se activan intracelularmente.

En algunos casos, un ligando que se une a un determinado receptor desencadena respuestas diferentes en distintas células blanco, lo cual se explica por las distintas maquinarias internas con las cuales los receptores están relacionados.

Las moléculas solubles se unen a receptores de membrana plasmática, que actúan como transductores; los receptores de membrana se han clasificado en tres tipos definidos por el mecanismo de transducción que utilizan, éstos son los receptores

acoplados a canales iónicos, receptores acoplados a enzimas y receptores acoplados a proteínas G o GPCR.

Los GPCRs actúan indirectamente para regular la actividad de proteínas blanco intracelulares que pueden ser una enzima o un canal iónico. La interacción entre el receptor y su proteína blanco es mediada por una tercera proteína trimérica acoplada a GTP (proteína G). Estos receptores también pueden estar unidos a otro tipo de proteínas y su activación puede desencadenar eventos intracelulares independientes de la proteína G a la que se encuentren acoplados. Todos los GPCRs son proteínas de 7 pases transmembranales (Franco y Franco, 2014).

Un grupo de los receptores del sistema purinérgico forman parte de la familia de GPCRs. Se sabe que tanto nucleósidos como nucleótidos de adenina y uridina actúan como factores de señalización extracelular, los cuales actúan a través de receptores de membrana conocidos como purinérgicos y que se clasifican en receptores de tipo P1 los cuales se activan por adenosina y son ejemplo de GPCRs; por otro lado, los receptores de nucleótidos pueden ser GPCRs, y son llamados receptores P2Y, o pueden ser receptores-canal llamados P2X.

Se sabe que existen diversos mecanismos de liberación de nucleótidos al medio extracelular además de varios tipos de ectonucleotidasas en el medio extracelular capaces de degradar dichos nucleótidos.

Un claro ejemplo de comunicación celular química y eléctrica es el que ocurre durante la foliculogénesis ovárica entre las células germinales y las células somáticas que las rodean. Desde hace ya varios años, diversos estudios han reportado evidencias que señalan que el sistema de señalización purinérgico tiene un papel relevante en esta comunicación en el folículo ovárico de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos de *Xenopus* cuentan con receptores purinérgicos en la capa de células foliculares, la clase de receptores descritos son del tipo P1 subtipo A2,

receptores que responden a la adenosina, y se encuentran acoplados a la síntesis de AMPc y que abren canales de potasio ($I_{K,AMPc}$). Por otro lado se han descrito los receptores P2Y que responden a ATP y UTP, estos modulan canales de Cl^- generando las corrientes rápida (F_{Cl}) y lenta (S_{Cl}) dependientes de Ca^{2+} (Arellano *et al.*, 1995, 2012).

Con la finalidad de estudiar las corrientes eléctricas que se generan en el folículo cuando se estimulan los diversos receptores purinérgicos también nos hemos enfocado en caracterizar a los receptores purinérgicos implicados en este sistema. La caracterización farmacológica se ha iniciado mediante la clonación de diversos receptores purinérgicos y su posterior expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus* inyectándolos con la secuencia de ADNc del receptor y estimulándolos con el agonista correspondiente según el receptor de interés. Lo anterior nos permitirá saber qué tipo de receptor o receptores purinérgicos se encuentran implicados en la generación de las respuestas nativas.

Debido a las características morfológicas que posee el folículo ovárico de la rana *Xenopus laevis*, éste ha sido utilizado como modelo del estudio de moléculas que se encuentran involucradas en los procesos de comunicación celular y los mecanismos presentes en la misma. Principalmente se ha hecho uso de la expresión heteróloga de diversos receptores de membrana, canales iónicos, transportadores y bombas iónicas en dicho modelo.

El folículo de *Xenopus laevis* está formado por diversas capas celulares. De la parte más externa hacia la más interna se encuentra el epitelio interno ovárico, posteriormente la teca, la monocapa de células foliculares, la membrana vitelina que es acelular y por último el ovocito.

Arellano y colaboradores mostraron que las células foliculares presentan comunicación eléctrica entre ellas y con el ovocito mediante uniones comunicantes y

que éstas proveen el microambiente adecuado para el desarrollo del ovocito. Se ha observado que en el ovocito se generan corrientes iónicas cuando éste es estimulado por agonistas, dichas corrientes se generan en el ovocito y en las células foliculares, éstas últimas transmiten dichas señales al ovocito a través de uniones comunicantes. Se ha descrito que dichas corrientes se llevan a cabo por flujo de iones Cl^- y K^+ .

Nuestro grupo de trabajo ha aportado evidencias que muestran que el sistema de señalización purinérgico modula esta comunicación en el folículo ovárico de *Xenopus laevis*, y por ello se ha iniciado la caracterización de los elementos que participan en dicha comunicación.

A partir de estudios descritos mediante resultados recientes del laboratorio se sugiere que la generación de la corriente F_{Cl} , que tiene una secuencia de agonistas correspondiente a $2\text{MeS-ATP} > \text{UTP} > \text{ATP}$, podría estar mediada en parte por el receptor P2Y4, cuya potencia de agonistas es $\text{ATP} \geq \text{UTP} > 2\text{MeS-ATP}$, pero esta farmacología no equivale a lo obtenido experimentalmente cuando se observa dicha corriente, es por ello que se cree que este fenómeno es el resultado de la asociación estructural y funcional de P2Y4 con algún otro receptor de tipo P2Y.

Antecedentes de nuestro equipo de trabajo sugieren que el receptor P2Y11 (con secuencia $2\text{MeS-ATP} > \text{ATP} >> \text{UTP}$) junto con el receptor P2Y4 podrían estar implicados en dicha respuesta ya que al ser coexpresados heterológamente en la membrana del ovocito, se observa un cambio importante que se ha identificado en una drástica disminución de la sensibilidad a 2MeS-ATP del receptor P2Y11. Lo anterior puede ser resultado de una asociación estructural oligomérica.

Por esta razón se decidió estudiar por microscopía confocal la localización de estos receptores coexpresados en células 1321N1.

2. ANTECEDENTES

Como en el caso de un amplio número de hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, entre otros, los nucleótidos promueven efectos fisiológicos mediante la activación de receptores membranales. Se ha observado que los nucleótidos pueden ejercer sus funciones de forma paracrina o autocrina y que su presencia en el medio extracelular resulta de la lisis celular, exocitosis de los gránulos que almacenan nucleótidos o por el flujo a través de las proteínas de membrana (Dubyak *et al.*, 1993) y que estos son rápidamente degradados por ectonucleotidasas.

Existen diversos tipos de enzimas localizadas en la superficie celular con la capacidad de hidrolizar los nucleótidos, estas enzimas incluyen las ectoalcalino fosfatasas, capaces de liberar fosfatos inorgánicos de una variedad de componentes orgánicos (degradación de nucleótidos 5'-tri, di y monofosfato) y ecto-5'-nucleotidasas, que catalizan la hidrólisis de nucleótidos 5'-monofosfatos a un nucleósido (Comunni *et al.*, 2000).

En diversos tipos celulares es constante la presencia de vesículas y gránulos de almacenamiento que liberan diversos neurotransmisores y hormonas mediante un proceso dependiente de calcio conocido como exocitosis. El ATP también se encuentra en gránulos secretores y puede ser liberado mediante el mismo mecanismo.

Otro mecanismo de liberación de nucleótidos es a través de conexiones, los cuales al acoplarse funcionan como la base molecular de la comunicación a través de uniones comunicantes entre células vecinas, y como entidades desacopladas en la membrana celular (algunas veces llamadas hemi-canales) permiten la liberación de factores intracelulares al medio extracelular (Eugenin *et al.*, 2012).

Se ha observado que, la adenosina y el ATP inhiben la transmisión sináptica, a pesar de la evidencia que muestra la presencia de receptores inhibitorios presinápticos P2Y que regulan la liberación de catecolaminas y otros neurotransmisores en el sistema nervioso central, no se han identificado los subtipos de receptores que regulan este proceso (Boehm y Kubista, 2002; von Kügelgen, 1992).

Algunos de los receptores a nucleótidos están enlazados a proteínas G heterotriméricas y por ello se les denomina receptores acoplados a proteínas G o GPCR por sus siglas en inglés y se sabe que en el genoma humano existen aproximadamente seiscientos miembros. Después de la activación del GPCR la subunidad $G\alpha$ del complejo heterotrimérico intercambia GDP por GTP, posteriormente ocurre la disociación de las subunidades $G\beta\gamma$, este intercambio permite la activación de una variedad de rutas de transducción como la activación de la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, quimiotaxis, degranulación, liberación de calcio, regulación transcripcional o expresión de genes (Jala y Haribabu, 2006).

Estos receptores al ser activados por el agonista pueden promover la producción de diferentes segundos mensajeros como inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DG) y AMPc. Además, la unión del ligando puede iniciar una serie de eventos que atenúan la señal vía sensibilización, secuestro o internalización del receptor. Se sabe que los GPCR interactúan con otras proteínas entre ellas otros GPCRs, cinasas, arrestinas, proteínas chaperonas, proteínas con dominios PH o PDZ, estas dos últimas se unen a fosfolípidos o reconocen regiones en el extremo carboxilo respectivamente (Zentella y Alcántara, 2003).

Los receptores acoplados a proteínas G que unen ATP se han denominado P2Y y se han descrito ocho tipos que pertenecen a este grupo que a su vez se encuentra dividido en dos subfamilias, la subfamilia de receptores P2Y1 incluye a los receptores

P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 los cuales activan principalmente proteínas $G_{q/11}$ y por lo tanto, promueven la hidrólisis mediada por fosfolipasa C- β de fosfatidilinositol bifosfato y la señalización a través de IP_3 y DG. Por otro lado, la subfamilia de receptores P2Y12 incluye a los subtipos P2Y12, P2Y13 y P2Y14 los cuales activan a proteínas G_i y por lo tanto, la señalización es a través de la inhibición de la adenilato ciclasa (Lutz *et al.*, 2005).

Por lo menos cuatro de los receptores de mamíferos P2Y son activados fisiológicamente también por UTP o UDP (Kim *et al.*, 2011). La afinidad principal de los receptores P2Y por los diferentes nucleótidos se ha descrito de la siguiente manera: para la subfamilia P2Y1 (ADP), P2Y2 (ATP/UTP), P2Y4 (UTP), P2Y6 (UDP) y P2Y11 (ATP) y para la subfamilia P2Y12 (ADP), P2Y13 (ADP), y P2Y14 (UDP/UDP-glucosa). Se sabe además que, el mismo receptor P2Y se puede acoplar a diferentes proteínas G, indicando una señalización que es específica del ligando y que involucra distintas conformaciones activas del receptor, por ejemplo, la activación del receptor P2Y11 por ATP incrementa los niveles de AMPc, IP_3 y calcio, mientras que su activación por UTP conduce a la movilización de calcio con ausencia de un incremento de los niveles de IP_3 o AMPc (White *et al.*, 2003).

Hasta el momento, la estructura cristalográfica de los receptores P2Y no ha podido ser resuelta, pero los modelos predicen la típica estructura de GPCRs incluyendo siete regiones hidrofóbicas transmembranales (TMs) unidas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares (Figura 1). También se ha descrito que algunos receptores P2Y tienen en sus dominios extracelulares cuatro residuos de cisteína, esto se ha mostrado en los receptores P2Y1, P2Y2 y P2Y12, es probable que formen dos puentes disulfuro: el primero entre el dominio N-terminal de la asa extracelular 3 y el segundo entre la asa extracelular 1 y 2 (Algaier *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2003; Hillmann *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, 1999). Se sabe que los dominios intracelulares de los receptores P2Y controlan la activación de la proteína G, la internalización del receptor y fenómenos de oligomerización.

Se ha demostrado que los GPCRs pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros y que esta interacción se puede dar entre miembros de la misma o de distinta subfamilia. Los receptores P2Y forman homo y heterodímeros tal como se ha descrito para otros GPCRs. Lo anterior parece ser relevante para la expresión y función del receptor, incluyendo su unión al agonista, potencia, eficacia y selectividad por la proteína G (Szidonya *et al.*, 2008).

La oligomerización de los receptores acoplados a proteínas G puede ocurrir mediante interacciones directas o indirectas. Las interacciones directas no involucran la participación de otras proteínas, sin embargo en las indirectas están involucradas otras proteínas que funcionan como puentes, los dominios intracelulares de los GPCRs se unen a un gran número de proteínas citosólicas, muchas de ellas son proteínas de andamiaje o *scaffolding proteins* que proveen una estructura con la cual los receptores interactúan entre ellos (Carriba, 2007).

Actualmente se sabe que, con algunas excepciones, los homodímeros parecen ser la forma predominante de GPCRs en la superficie celular (Franco y Franco, 2014).

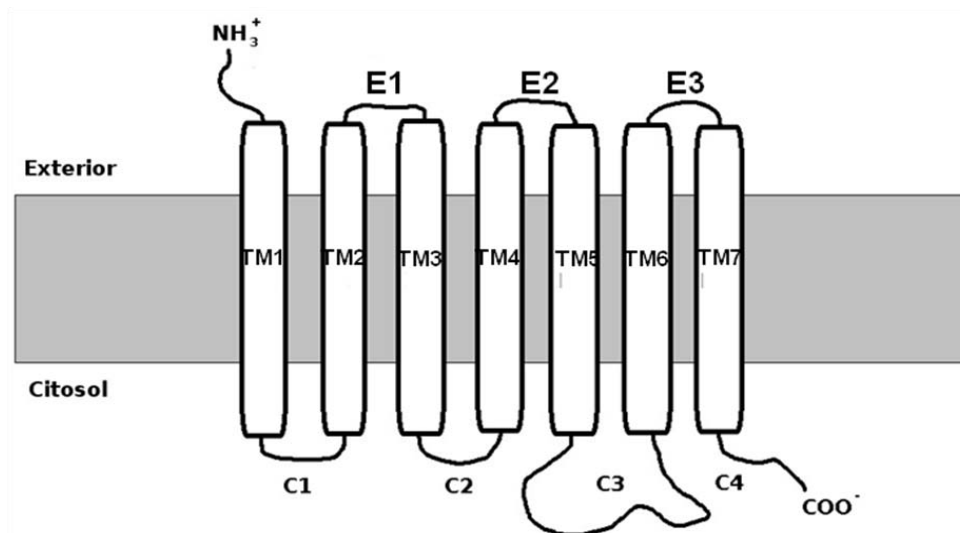


Figura 1. Modelo de la estructura de los receptores P2Y basado en el receptor 2β-adrenérgico (modificado de Retama, 2006).

Ciruela y colaboradores en 2012, mostraron que el control de la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en el estriado es regulado por GPCRs y que estos comparten una organización supramolecular con receptores a dopamina y glutamato. Estos oligómeros pueden aumentar la diversidad y especificidad por la cual las señales extracelulares son transferidas a las proteínas G en los procesos de transducción del receptor e incluso pueden permitir regulaciones alostéricas receptor-receptor, además de que estas condiciones vulneran las funciones dentro del estriado tanto en condiciones patológicas como normales.

En 2009, Schicker y colaboradores, utilizando ensayos de FRET analizaron la dimerización entre diversos pares de receptores, entre ellos A1, A_{2A}, P2Y1, P2Y2 y P2Y12 y mostraron que estos GPCRs son capaces de formar oligómeros. Por otro lado, se sabe que los GPCRs también pueden formar oligómeros con enzimas responsables de la hidrólisis de nucleótidos, lo que permite sugerir que los efectos fisiológicos de los nucleótidos se encuentran regulados por un sistema de enzimas y receptores ubicado en la membrana plasmática y no por proteínas aisladas y que, dependiendo de las moléculas implicadas, se darán diversas respuestas al ATP, al ADP y a la adenosina (Oyanagi *et al.*, 2006).

Por ejemplo, existen evidencias que muestran la dimerización establecida entre el receptor P2Y1 y el receptor a adenosina A1, estos dímeros muestran marcadas diferencias en sus propiedades farmacológicas al ser comparados con los receptores individuales. La formación de esta estructura genera un receptor a adenosina cuya farmacología es parecida a la que presenta el receptor P2Y1, un potente agonista de P2Y1, la adenosina 5'-O-(2-tiodifosfato) o ADPβS, es reconocida por el sitio de unión del complejo A1R/P2Y1R e inhibe la actividad de la adenilato ciclasa vía la proteína Gi/o (Nakata *et al.*, 2005).

Con respecto a lo anterior Franco y Franco en 2014, mencionaron que los dímeros tienen dos sitios de unión, uno en cada protómero, cada sitio de unión tiene su

propia afinidad para un determinado ligando, la formación del dímero puede provocar cambios conformacionales que afectan los sitios de unión. En el caso de los receptores metabotrópicos glutamatérgicos que pertenecen a la familia C de GPCRs se ha observado que éstos pueden formar dímeros en los cuales cuando un agonista se une a uno de los protómeros la señalización del dímero es a través de la proteína G que se encuentra unida al segundo protómero.

La formación de heterómeros provoca cambios conformacionales que se traducen no solo en el cambio por la afinidad de alguno de los protómeros presentes sino que incluso puede provocar que la nueva estructura se asocie con una proteína G distinta a aquella que regularmente se asociaría de manera independiente cualquiera de las unidades involucradas, lo anterior se ha observado en el caso de receptores a dopamina del tipo D1 y D2. Por otro lado, se sabe que el receptor GABA_B está constituido por los receptores GABA_{B1} y GABA_{B2}, y que éste no es funcional cuando dichos receptores se expresan de forma individual.

Otro ejemplo es la dimerización establecida entre los receptores P2Y11 y P2Y1. El receptor P2Y11 por sí mismo no experimenta internalización, pero cuando está expresado como heterodímero con el receptor P2Y1 se internaliza de una manera que depende de la concentración del agonista (Ecke *et al.*, 2008).

También se ha reportado la dimerización de los receptores P2Y4 y P2Y6. D'Ambrosi y colaboradores en 2007, observaron en células PC12 que el receptor endógeno P2Y4 forma oligómeros solo con el receptor P2Y6. Estos resultados indican que la estructura cuaternaria que se distingue entre P2Y4 y P2Y6 parece ser crucial para esta asociación, los autores establecieron la propensión del receptor P2Y4 para formar interacciones diméricas.

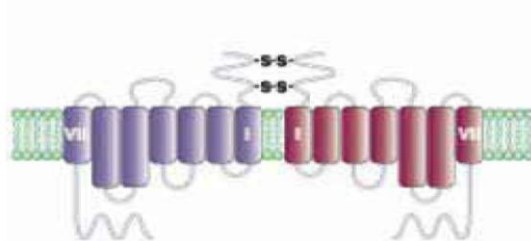
Debido a la gran complejidad estructural de los receptores no es posible generalizar un solo tipo de interacción directa. Se ha observado que estas

interacciones pueden llevarse a cabo mediante enlaces covalentes (puentes disulfuro) y/o no covalentes (fuerzas hidrofóbicas y/o electrostáticas) entre los dominios transmembrana y/o los dominios intracelulares de los receptores (Figura 2) (Carriba, 2007).

Se sabe que en ciertos GPCRs, el dominio NH₂ terminal extracelular contiene residuos de cisteína que pueden contribuir a la dimerización mediante la formación de puentes disulfuro. En el caso del receptor metabotrópico de glutamato mGlu, se ha demostrado que éste puede formar homodímeros, pero que al eliminar el dominio amino terminal, se evita la dimerización del receptor. Aún cuando los puentes disulfuro tienen un papel importante en la formación de los dímeros, otras interacciones no covalentes presentan un papel relevante en la formación de estas estructuras como fue demostrado para el receptor mGlu5 (Romano *et al.*, 1996). Por otro lado también existen evidencias que han demostrado que el dominio COOH-terminal de los GPCRs participa en los fenómenos de oligomerización.

Formación de puentes disulfuro

Receptores de calcio y glutamato



Interacción transmembrana

R. dopamina, muscarínicos, β_2 -adrenergicos

Interacción *coiled-coil*

Receptores GABA_B

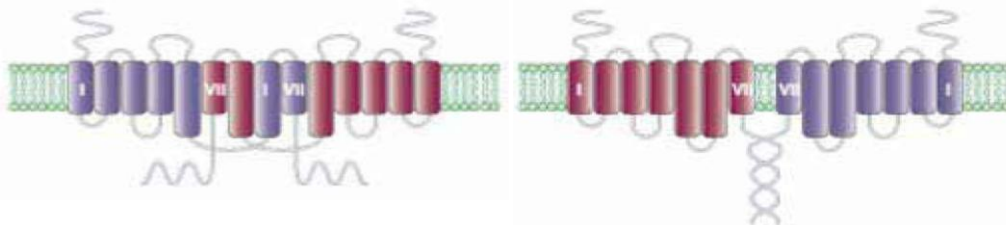


Figura 2. Modelos basados en algunos ejemplos de interacciones directas que pueden establecerse entre receptores durante la formación de oligómeros (*modificado de Carriba 2007*).

Por ejemplo, se demostró que las dos isoformas de los receptores GABA_B pueden presentar interacciones directas entre los dominios *coiled-coil* (Figura 2) que se encuentran localizados en sus extremos COOH-terminal (White *et al.*, 1998). Además, en el caso del receptor δ -opioide se ha observado que cuando se deletan los últimos 15 aminoácidos del dominio COOH-terminal, éste pierde la capacidad para formar dímeros (Cvejic y Devi, 1997).

Diversos GPCRs interactúan con la subunidad α de la proteína G utilizando los residuos en los tractos intracelulares yuxtamembranales que colindan con TM6 y TM7. Evidencias recientes muestran que el mantenimiento de ciertos dímeros puede depender de la asociación con las subunidades funcionales Gi α como fue demostrado para el receptor del neuropéptido Y. La unión de los dímeros con las proteínas G vía las dos hélices puede ser la primera y renovable forma de organización de los receptores del neuropéptido Y (Parker *et al.*, 2011).

Resulta difícil definir la naturaleza de las interacciones que provocan la oligomerización de los GPCRs, las cuales pueden modificar las propiedades de los receptores así como su tráfico a la membrana plasmática (Szidonya *et al.*, 2008).

El acoplamiento de receptores P2Y a diversas proteínas G y las rutas de señalización sugieren que la activación del receptor puede conducir a la inducción de más de un estado conformacional (Figura 3) que permite la asociación con diferentes subunidades α . Esto podría explicar cómo la activación del receptor P2Y₁₁ por ATP puede estimular la adenilato ciclasa conduciendo a un importante aumento en el AMPc, y puede activar PLC para inducir la formación de IP₃ y la movilización de Ca²⁺ intracelular, mientras que la activación del receptor P2Y₁₁ por UTP moviliza Ca²⁺ sin incrementar la concentración de IP₃ o de AMPc (White *et al.*, 2003). Diversos estudios han demostrado interacciones funcionales entre diferentes GPCRs y sus efectores, así como entre GPCRs y otras proteínas de señalización tales como canales iónicos e integrinas. La interacción entre receptores canales iónicos P2X y GPCRs P2Y también ha sido demostrada (Erb *et al.*, 2006).

La interacción entre receptores puede producir un cambio a nivel de segundos mensajeros. Se ha demostrado que la coactivación de los receptores P2Y acoplados a G_i o a $G_{q/11}$ induce un aumento sinérgico en la concentración de Ca^{2+} e IP_3 intracelular comparado con la activación de los receptores P2Y acoplados a $G_{q/11}$ únicamente. Existe información que demuestra que las interacciones entre dos distintos GPCRs confieren propiedades de señales de transducción que no son explicadas por la acción de los GPCR por separado (Yoshioka *et al.*, 2001).

Actualmente existen diversas evidencias que demuestran que la formación de heterómeros ocurre en casi cualquier célula de cualquier tejido. Además de diversas técnicas para determinar la formación de heterómeros, actualmente se conoce una técnica llamada "*in situ* proximity ligation assay" y consiste en detectar dichas estructuras en rebanadas de tejido natural haciendo uso de anticuerpos específicos y ensayos de amplificación.

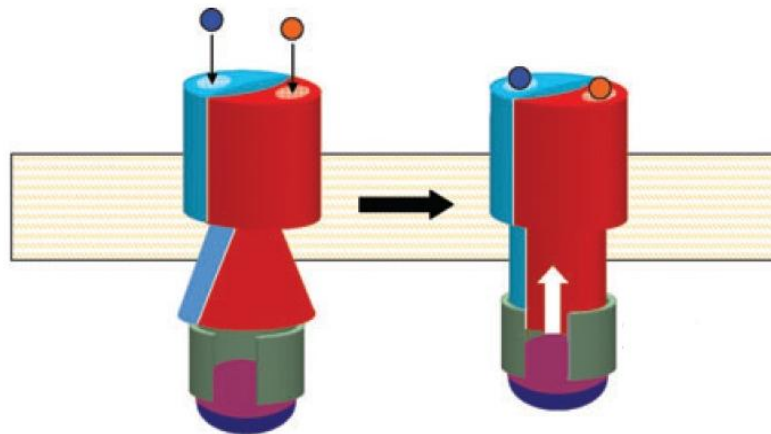


Figura 3. Modelo de un ejemplo de interacción que se establece con la proteína G después de llevarse a cabo la unión de dos receptores distintos. El heterodímero se une a una proteína G, la cual es activada por la estimulación de ambos protómeros (obtenido de Maggio *et al.*, 2007).

A modo de conclusión, se sabe que los GPCRs son funcionales cuando se encuentran como monómeros pero también han mostrado la capacidad de existir como dímeros, heterómeros u oligómeros de estructuras más complejas.

2.1. El folículo de *Xenopus laevis*

El folículo ovárico de *Xenopus laevis* presenta características morfológicas y funcionales que permite su uso como modelo para el estudio de la comunicación inter e intracelular. Se ha demostrado que existen GPCRs en las células foliculares y que estos promueven la producción de corrientes iónicas generadas al estimularlos con sus agonistas.

De manera particular se han caracterizado en el folículo dos tipos de corrientes que están mediadas a través de receptores purinérgicos y son acarreadas por iones Cl^- y K^+ . Los canales de Cl^- que participan en estas respuestas se encuentran expresados en la membrana de las células foliculares y su activación genera dos tipos de respuestas denominadas F_{Cl} (corriente rápida de Cl^-) y S_{Cl} (corriente lenta de Cl^-) (Arellano *et al.*, 1998; 2012), ha sido demostrado que estas corrientes dependen de un aumento de Ca^{2+} intracelular en las células foliculares.

En un experimento realizado por Arellano y colaboradores en 1998, se observó que el pretratamiento del ovocito con la toxina Pertusis disminuyó en un 50% la respuesta de F_{Cl} y S_{Cl} generadas por ATP, con lo que se demostró que los receptores específicos para este transmisor pertenecen a los GPCRs, además de que, se observó que esta respuesta también era activada por UTP, el cual solo actúa a través de GPCRs.

Además, por experimentos realizados en ovocitos desprovistos de células foliculares (Arellano y Miledi, 1993) se observó que ambas corrientes (Cl^- y K^+) eran eliminadas, por lo que se demostró que estas se originaban en la monocapa de células foliculares y que probablemente estas son transmitidas mediante comunicación eléctrica al ovocito. La identidad de los canales implicados en estas respuestas y de los receptores a ATP que las generan es aún desconocida, sin embargo, resultados preliminares del laboratorio sugieren la participación del receptor P2Y4 (definido originalmente como receptor P2Y8) y probablemente del receptor P2Y11. La activación de estas corrientes foliculares debidas al ATP pueden tener un papel fisiológico importante, ya que se ha observado que el ATP, es liberado del ovocito y es capaz de

activar corrientes endógenas en la membrana de las células foliculares actuando como transmisor parácrino (Maroto y Hamill, 2001; Saldaña *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

Entre los procesos más relevantes del control de la foliculogénesis ovárica se encuentra sin duda, el de la comunicación química y eléctrica establecida entre las células germinales y las células somáticas que las rodean. Nuestro grupo de trabajo ha aportado evidencias que muestran, que el sistema de señalización purinérgico es parte importante de esta comunicación en el folículo ovárico de *Xenopus laevis*, y por ello se ha iniciado la caracterización de los elementos que participan en dicha comunicación.

Además de estudiar las respuestas eléctricas (F_{Cl} , S_{Cl}) generadas en el folículo ovárico en presencia de agonistas purinérgicos, también estamos interesados en caracterizar los receptores purinérgicos presentes en este sistema y los mecanismos intracelulares que activan. Para ello, las secuencias codificantes de diferentes receptores P2Y de *Xenopus* han sido clonadas y sus características farmacológicas comienzan a ser estudiadas expresándolos funcionalmente en ovocitos inyectados con la secuencia del cARN correspondiente. Esta caracterización podría permitirnos definir los receptores que participan en cada una de las respuestas nativas estudiadas.

Resultados recientes del laboratorio sugieren que la generación de la corriente F_{Cl} , que tiene una secuencia de agonistas correspondiente a 2MeS-ATP>UTP>ATP, podría estar mediada en parte por el receptor P2Y4, cuya potencia de agonistas es de ATP≥UTP>2MeS-ATP, por lo que la farmacología de este receptor no reproduce las características del receptor nativo que activa la F_{Cl} , y por ello planteamos que ésta podría ser mediada por otro receptor o por una combinación de receptores purinérgicos.

Una hipótesis de trabajo de nuestro laboratorio propone que el receptor P2Y11 (con secuencia 2MeS-ATP>ATP>>UTP) y el receptor P2Y4 podrían ser dos de los receptores implicados ya que al ser coexpresados heterológicamente en la membrana del ovocito, las respuestas obtenidas muestran cambios en su selectividad por los

agonistas; el cambio más importante que se ha identificado es una drástica disminución de la sensibilidad a 2MeS-ATP del receptor P2Y11 cuando se encuentra coexpresado con el receptor P2Y4.

Existen posibles explicaciones al fenómeno mencionado, dos de ellas son el que los receptores formen heterómeros con propiedades diferentes, o que el receptor P2Y4 ejerza una modulación sobre el P2Y11 de forma independiente a interacciones directas.

Por esta razón se decidió estudiar por microscopía confocal la localización de estos receptores coexpresados en células 1321N1.

4. HIPÓTESIS

Los receptores purinérgicos P2Y4 y P2Y11 de la rana *Xenopus* presentan interacciones y estas pueden ser funcionales.

5. OBJETIVOS

1. Construir una proteína quimérica del receptor P2Y11 y la proteína fluorescente roja (P2Y11-RFP).
2. Determinar la localización celular de los receptores P2Y11-RFP y P2Y4-GFP.
3. Determinar, si los receptores P2Y4 y P2Y11 fusionados a las proteínas fluorescentes se colocan.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Diferentes protocolos de PCR fueron empleados para amplificar fragmentos de ADN de interés.

PCR para amplificar el fragmento codificante del receptor P2Y11 de *Xenopus*, flanqueado por la secuencia de reconocimiento de las enzimas BamHI y EcoRI. Se hizo una mezcla de reacción que contenía 46 µl de Mix high fidelity (invitrogen), 2 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos (2µl) y 10 ng del vector pXenY11 (2 µl). Las condiciones de amplificación fueron 95°C 2 minutos, 22 ciclos a 95°C 30 segundos, 55°C 40 segundos y 72°C 70 segundos con una extensión final de 5 minutos.

PCR para identificar bacterias portadoras de plásmidos pJet recombinantes con secuencias de interés, se realizó una mezcla total para 10-20 reacciones de 20 µl conteniendo como concentración final: 1X buffer para la Taq polimerasa, 25 mM Cl₂Mg, 0.2 mM dNTPs, 2 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos pJetF y pJetR y 0.1 unidad de taq polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes 95°C 2 minutos, 30 ciclos a 95°C 30 segundos, 60 °C 40 segundos y 72 °C de 40 a 70 segundos con una extensión final de 5 minutos.

6.2. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Una vez realizadas las amplificaciones o restricciones, los fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X y purificados usando el kit de Zymed. Para ello, el gel de agarosa se visualizó en un transiluminador y se recortó la región que contenía el fragmento de interés. Este se colocó en un tubo y se mezcló con tres volúmenes de la solución 1 del kit. Se incubó a 50° C por 10 minutos para disolver la agarosa y posteriormente se pasó por una columna para retener el ADN y eliminar la agarosa. El ADN retenido se lavó dos veces y se eluyó con 10 µl de agua.

6.3. Digestión de plásmidos

Para la clonación de fragmentos de ADN en los vectores pDsRed-N1 o pXENEX, o para linearizarlos y tener el molde para ensayos de transcripción *in vitro*, éstos se digirieron con las enzimas de interés en un volumen de 30-100 µl y de 3 a 5 unidades de cada una de las enzimas y 1X del buffer correspondiente. En caso de dobles restricciones, y cuando las condiciones de restricción no eran compatibles, se procedió a digerir primero con una enzima, hacer una extracción fenólica y precipitación del ADN y posteriormente la segunda restricción con el buffer 1X específico para la segunda enzima.

El plásmido empleado para la clonación fue el pDsRed N1-monomérico que codifica una mutante monomérica derivada de la proteína fluorescente roja de *Discosoma sp.* para ello, se diseñaron dos oligonucleótidos que complementaban con la región 5' y 3' del cADN codificante del receptor P2Y11 de *Xenopus*. Los sitios de reconocimiento para las enzimas BamHI y EcoRI fueron adicionados a uno u otro de los oligonucleótidos a fin de permitir la clonación del fragmento codificante del receptor P2Y11 de manera orientada en el vector pDs-Red-N1. Además, el oligonucleótido 3' se diseñó de tal manera que se eliminara el codón de paro y se mantuviera el marco de lectura abierto en fase con el de la proteína fluorescente roja. Como molde se usó el plásmido pCMV6-P2RY11 donde se encuentra la secuencia codificante del receptor P2Y11 de *Xenopus*, éste fue obtenido comercialmente.

6.4. Defosforilación

Para ligar fragmentos de interés en los vectores pDs-RedN1 o pXENEX los plásmidos que se emplearían para clonar los fragmentos de interés fueron digeridos y defosforilados para evitar su autoligación. Para ello, después de la restricción se inactivó la enzima por calor calentando la muestra a 65 °C por 15 minutos. Posteriormente de 50-100 ng de ADN (1 a 4 µl) se mezclaron con agua y 0.9 µl del buffer 1X de la fosfatasa alcalina de Roche (Cat: 04 898 133 001) y 1 unidad de la

enzima en un volumen final de 10 μ l. La mezcla se incubó a 37 °C por 30 minutos y posteriormente la enzima se inactivó calentando la reacción a 65 °C por 15 minutos.

6.5. Ligación

Para la ligación se empleó de 50 a 100 ng del vector y 50 a 300 ng del fragmento de interés.

Para el caso de la clonación de fragmentos de PCR, éstos se ligaron en el vector pJet. Para ello de 2-6 μ l del fragmento purificado del gel se mezcló con 5 μ l de buffer 2X, 1 Unidad de la enzima Blunt en un volumen final de 18 μ l. La reacción se incubó a 70 °C por 5 minutos y luego incubó en hielo para adicionar 1 μ l de vector pJet linearizado y 1 μ l (1 Unidad) de T4 ligasa. Se incubó de 1 a 16 horas a temperatura ambiente antes de usar la mezcla para transformar bacterias.

6.6. Transformaciones

De 50 a 100 μ l de células competentes obtenidas de la Unidad de Proteogenómica del INB. Se mezclaron con 5-10 μ l de la mezcla de ligación 50-100 μ l de células competentes. Se dejaron reposar en hielo de 20-30 min. Se les dio un choque térmico de 3 min a 42°C y se devolvieron al hielo 2 min para su recuperación. Se agregaron 500 μ l de medio LB (Lysogeny broth) sin antibiótico y se les incubó durante 1hr a 37°C en agitación. Posteriormente, se efectuaron las diluciones requeridas para sembrar con pipeta de cristal flameada (normalmente 400 μ l de dilución 1:100) en placas con Ampicilina 80ug/ml ó Kanamicina 30ug/ml. Las placas se incubaron a 37°C (a excepción de las transformantes con el vector pGL4.11-Arc 7000-Venus-pest, que crecen a baja temperatura, entre 30 y 33°C) manteniéndose en observación hasta obtener suficientes colonias.

6.7. Extracción de ADN plasmídico

Se sembraron colonias de bacterias en 25-50 ml de medio LB con antibiótico (80

$\mu\text{g/ml}$ en el caso de Ampicilina y $30 \mu\text{g/ml}$ en el caso de Kanamicina) y se incubaron en agitación por al menos 12 horas a 37°C . Posteriormente, las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, y la pastilla se resuspendió en 2ml solución I (TRIS (25mM)–Glucosa (50mM)–EDTA(10mM)). Después, se agregaron 4ml de solución II (SDS 1% y NaOH 0.2N preparada en el momento), y se mezcló suavemente. El lisado celular se mezcló con 3 ml de solución III (acetato de potasio (5M) 60% y ácido acético 11.5%) y se dejó reposar 5min en hielo. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 4°C y 9000 rpm durante 15min. El sobrenadante se filtró a través de una gasa, se precipitó con isopropanol (0.6 vol) mezclando y dejando reposar 10min. Nuevamente se centrifugó y la pastilla se lavó con 5ml de etanol 75% y se resuspendió en 1 ml de solución de TRIS-EDTA (Tris 10mM pH 7.6, EDTA 1mM, pH 8). Posteriormente se adicionaron $5 \mu\text{l}$ de RNAasa [$10 \mu\text{g/ml}$] y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. El ADN se precipitó con una solución de polietilenglicol-NaCl (13% Polietilenglicol, 6M NaCl) dejando reposar 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10min a 13,000 rpm. Finalmente, la pastilla se lavó con etanol al 80%, se dejó secar, y el ADN se resuspendió en agua libre de nucleasas.

6.8. Transfección

Células HEK293 Adherentes (AD293) y 1321N1 fueron sembradas en placas de 12 pozos a una densidad que permitiera tener una confluencia del 90 % el día de la transfección. Las células se mantuvieron en los pozos con 1 ml de medio DMEM alto en glucosa sin antibióticos y 10 % suero bovino fetal. El día de la transfección se hicieron mezclas de ADN con medio optimen y lipofectamina medio optimem. En general se emplearon de 1.6 a $2 \mu\text{g}$ de plásmido para cada transfección diluyéndolo en $100 \mu\text{l}$ de optimem. La lipofectamina se mezcló en una relación de $4 \mu\text{l}$ por cada $100 \mu\text{l}$ de medio optimem 5 minutos después de hacer estas mezclas, se combinaron $100 \mu\text{l}$ de la mezcla conteniendo el plásmido con $100 \mu\text{l}$ de la que contenía la lipofectamina. Se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a adicionar los $200 \mu\text{l}$ resultantes a cada pozo.

Un día después de la transfección se cambió el medio y se dejó incubando por otras 24 horas antes de analizar las células u obtener las proteínas. En algunos casos la transfección solo fue por 24 horas.

6.9. Obtención de proteínas totales de células transfectadas y análisis por western blot

De 24 a 48 horas después de la transfección, las células fueron lisadas directamente en la placa de cultivo con 100 a 200 μ l de buffer 2X Laemmli (4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % 2-mercaptoetanol, 0.004 % azul de bromofenol, 0.125 M Tris HCl). Los extractos celulares se incubaron en agua en ebullición por 7 minutos y las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis por western blot. De 10 a 20 μ l de cada uno de los extractos se analizaron en geles de acrilamida-SDS al 12-15 % y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente las membranas se bloquearon por una hora con una mezcla de TBS-tween (150 mM NaCl, 20 mM tris pH 7.4) leche al 5 %. Posteriormente se adicionó el anticuerpo anti GFP o anti RFP a una dilución de 1:1000 y se incubó toda la noche a 4 °C. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween y se incubó con el segundo anticuerpo a una dilución de 1:1000 por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados y se hizo la detección con el kit de luminiscencia de GE como describe el proveedor.

6.10. Fijación de células

Se preparó una mezcla de poli-D-lisina (5ml de H₂O estéril + 100 μ l de poli-D-lisina), se colocó la mezcla anterior en vidrios de aproximadamente 5 mm de diámetro, la mezcla permaneció ahí entre 45 minutos y 1 hora, pasado dicho tiempo se retiró el exceso de la misma. Posteriormente se realizaron 3 lavados con H₂O estéril a cada vidrio, se colocaron los vidrios en cajas petri y se dejaron secar. Una vez hecho lo anterior las células transfectadas fueron tratadas con tripsina durante 5 minutos para despegarlas de la base del pozo, se les adicionó medio DMEM completo y se tomó una

alícuota que se colocó sobre cada uno de los vidrios, las células se dejaron 3 horas en los vidrios con el fin de que se adhirieran. Pasado este tiempo se procedió a fijar las mismas, para lo cual se les retiró el medio y se les adicionó PBS, posteriormente se sumergieron los vidrios en una caja petri la cual contenía acetona fría y permanecieron ahí durante 8 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS, una vez hecho lo anterior se tomaron los vidrios con mucha precaución y se les colocó sobre papel absorbente con la finalidad de que se secara lo mejor posible el PBS. Por último, se colocó una gota de vectashield (inhibe el blanqueamiento de fluorocromos) en un portaobjetos y se colocó cada vidrio en cada portaobjetos, teniendo precaución en que el lado que tenía a las células coincidiera con el lado del portaobjetos que tenía el vectashield, posteriormente se fijaron los vidrios adicionando barniz alrededor del vidrio, por último se procedió al análisis de imágenes por microscopia de fluorescencia.

6.11. Obtención de membranas

Para la obtención de membranas totales de las células transfectadas, las células se recuperaron raspándolas con buffer (Tris 1M; sacarosa 1M; EDTA 1M, pH 8; Mini complete; agua) y se rompieron con 30 inmersiones del pistilo de un homogenizador tipo "Potter-Elvehjem". Posteriormente las muestras se centrifugaron diferencialmente tres veces empleando 500 rpm por 10 minutos en la primera centrifugación; 3500 rpm por 10 minutos en la segunda y 14 000 rpm 20 minutos en la tercera. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a 4 °C. A partir de la última centrifugación, se obtuvo la fracción soluble para obtención de RFP y GFP, y la pastilla para obtención de las proteínas de membrana P2Y11-RFP y P2Y4-GFP. Posteriormente éstas se resuspendieron en una solución que contenía TNTE 0.1 % + inhibidor de proteasas. Posteriormente se determinó la cantidad de proteína en cada muestra mediante el método de Bradford. En caso necesario, las proteínas fueron concentradas precipitando con ácido tricloroacético (TCA). Para ello, se adicionó el ácido en una proporción de 17 µl de TCA por cada 50 µl de muestra y las muestras se colocaron en hielo por 15 minutos y posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La pastilla, se lavó con 30 µl de acetona, se secó a temperatura

ambiente y las proteínas se disolvieron en buffer Laemmli 2x.

6.12. Microscopía confocal

Una vez transfectadas las células, fueron sembradas 24 horas después en vidrios con poli-D-lisina, como se describe anteriormente, posterior a la siembra se dejaron pegar las células 3 horas únicamente con la finalidad de que, al fijarlas, tuvieran forma redondeada. Pasadas las tres horas, las células fueron fijadas como se describe previamente pero en este caso, después del segundo lavado los vidrios fueron sumergidos en una solución que contenía 1 μ l del fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), el cual es un colorante fluorescente que se une a las regiones ricas en Adenina y Timina del ADN, y 1 ml de PBS, los vidrios se dejaron en dicha solución durante 20 minutos en condiciones de poca luz, posteriormente fueron lavados con PBS y se procedió a montarlos en portaobjetos con vectashield como se describe anteriormente.

Las preparaciones fueron observadas en el microscopio confocal de barrido por láser Axiovert 200 M con un sistema LSM 510 Meta-multifotónico (Carl Zeiss). Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el software AIM LSM 510 (Carl Zeiss) con la finalidad de realizar las construcciones de las sesiones ópticas. Las construcciones ópticas se realizaron mediante el empalme de imágenes en rebanada que fueron tomadas cada 5 μ en coordenada Z, también se obtuvieron imágenes en serie de cada 5 μ en la misma coordenada.

Después se determinó matemáticamente la interdependencia de los canales utilizando los programas de procesamiento digital de imagen AIM LSM 510 e Image J, éste último programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health, la interdependencia de las variables se calculó estadísticamente utilizando el coeficiente de correlación de Pearson que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente.

7. RESULTADOS

Con la finalidad de determinar la localización celular de los receptores P2Y4 y P2Y11, se decidió construir proteínas de fusión entre los receptores y proteínas

fluorescentes para facilitar su seguimiento. Previamente en el laboratorio se construyó el plásmido P2Y4-GFP, una fusión entre el receptor P2Y4 de *Xenopus* y la proteína verde fluorescente, y en este trabajo se construyó el plásmido P2Y11-RFP el cual permite la síntesis de la proteína P2Y11 con la proteína fluorescente roja fusionada a la región carboxilo terminal. El plásmido empleado para la clonación fue el pDsRed N1-monomérico que codifica una mutante monomérica derivada de la proteína fluorescente roja de *Discosoma sp.*

Como se observa en la figura 4, después del ensayo de PCR y empleando los oligonucleótidos y el molde antes descritos, se obtuvo un fragmento de ADN de 900 pb, éste fue purificado y clonado en el vector pJET 1.2 para secuenciarlo. Una vez verificada la identidad del fragmento de ADN, se procedió a subclonarlo en el vector pDsRed-monomérico en los sitios BamHI y EcoRI. Con el fin de verificar la clonación, el plásmido purificado fue digerido con la enzima Sbf1 que libera un fragmento de 700 pb (Figura 5).

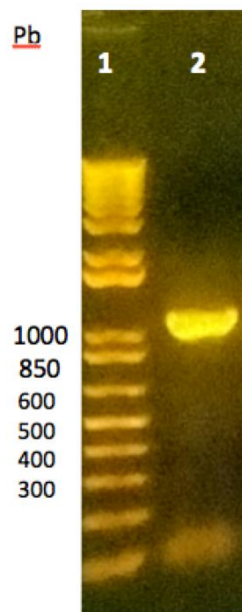


Figura 4. Obtención de la secuencia codificante del receptor P2Y4 por PCR. Como molde se empleó el plásmido pCMV6-P2RY11. 1) marcador de peso, 2) Producto de amplificación.

Una vez construido el vector, se procedió a realizar ensayos de transfección transitoria en células AD293. Esta línea celular tiene una alta eficiencia de transfección y ha sido empleada como modelo para el estudio de receptores de membrana. Las células fueron transfectadas como se describe en material y métodos empleando los plásmidos pEGFP-N1 (al cual nos referiremos como GFP), pDsRed-Monomer-N1 (al cual nos referiremos como RFP) y el vector P2Y11-RFP. El plásmido GFP codifica para una variante de la proteína fluorescente verde que es más brillante que la nativa y serviría para determinar la eficiencia de transfección, mientras que el RFP serviría para comparar la expresión de la proteína fluorescente roja y la de la fusión con el receptor.

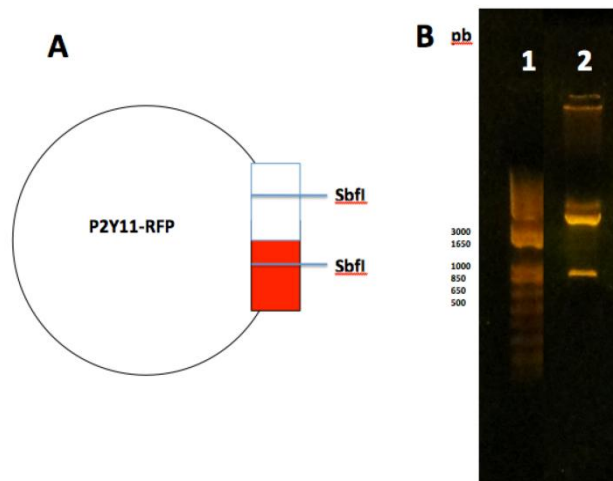


Figura 5. Clonación del fragmento codificante del receptor P2Y11 de manera orientada en el vector pDs-Red-N1. 1) Marcador de peso, 2) restricción del plásmido P2Y11-RFP con la enzima SbfI.

Como se puede observar en la figura 6, las células AD293 mostraron una alta eficiencia de transfección ya que más del 80 % de las mismas expresan las proteínas fluorescentes. También, es evidente que la fluorescencia observada en las células transfectadas con el plásmido GFP es mucho mayor que la observada en las células transfectadas con el plásmido RFP.

Mientras que las proteínas GFP y RFP se localizan en el citoplasma, la proteína de fusión P2Y11-RFP tiene una distribución membranal y en cúmulos en el citoplasma

celular. Esta distribución del receptor es esperada y muestra que la fusión con la proteína fluorescente no altera esta característica y por lo tanto, el receptor podría ser funcional.

A pesar de que las células HEK293T muestran una alta eficiencia de transfección tienen una limitación como modelo de estudio de receptores P2Y y es que expresan varios de ellos. Ya que en este trabajo estamos interesados en estudiar la interacción receptor-receptor, y que los receptores endógenos de las células podrían acoplarse con los exógenos influyendo en los resultados, se decidió utilizar la línea celular 1321N1 debido a que no expresa receptores del tipo P2Y.

Las células 1321N1 fueron transfectadas con los plásmidos GFP, RFP, P2Y4-GFP o P2Y11-RFP. El plásmido P2Y4-GFP fue construido previamente en el laboratorio y codifica la proteína de fusión entre el receptor P2Y4 de *Xenopus* y la proteína GFP. Como se observa en la figura 7, al igual que en las células AD293, al transfectar células 1321N1 con los plásmidos codificantes de las proteínas GFP y RFP la fluorescencia se distribuye en toda la célula mientras que las proteínas de fusión P2Y4-GFP o P2Y11-RFP se localizan principalmente en la membrana o cercana a esta además también se distinguen cúmulos en el citoplasma celular.

Estos resultados sugieren que ambas proteínas de fusión se localizan en la membrana y que los receptores podrían mantener su funcionalidad, por lo que pueden ser empleadas para determinar si estos receptores colocalizan en la célula cuando se coexpresan.

La aproximación empleada hasta ahora consistió en observar a las células transfectadas *in vivo* empleando un microscopio de epifluorescencia. Sin embargo y para definir con precisión donde se ubican los receptores se decidió transfectar las células 1321N1 y 24 horas después despegarlas de las cajas de cultivo a través de un tratamiento enzimático, para posteriormente sembrarlas sobre portaobjetos permitiendo que iniciaran el proceso de adhesión sin que éste se completara. Posteriormente las

células se fijaron y se observaron en un microscopio confocal de barrido por láser Axiovert 200 M, esta estrategia facilitaría la observación de las células ya que su morfología sería redondeada y permitiría hacer un análisis más preciso de la ubicación de los receptores (Rangel-Yescas *et al.*, 2012).

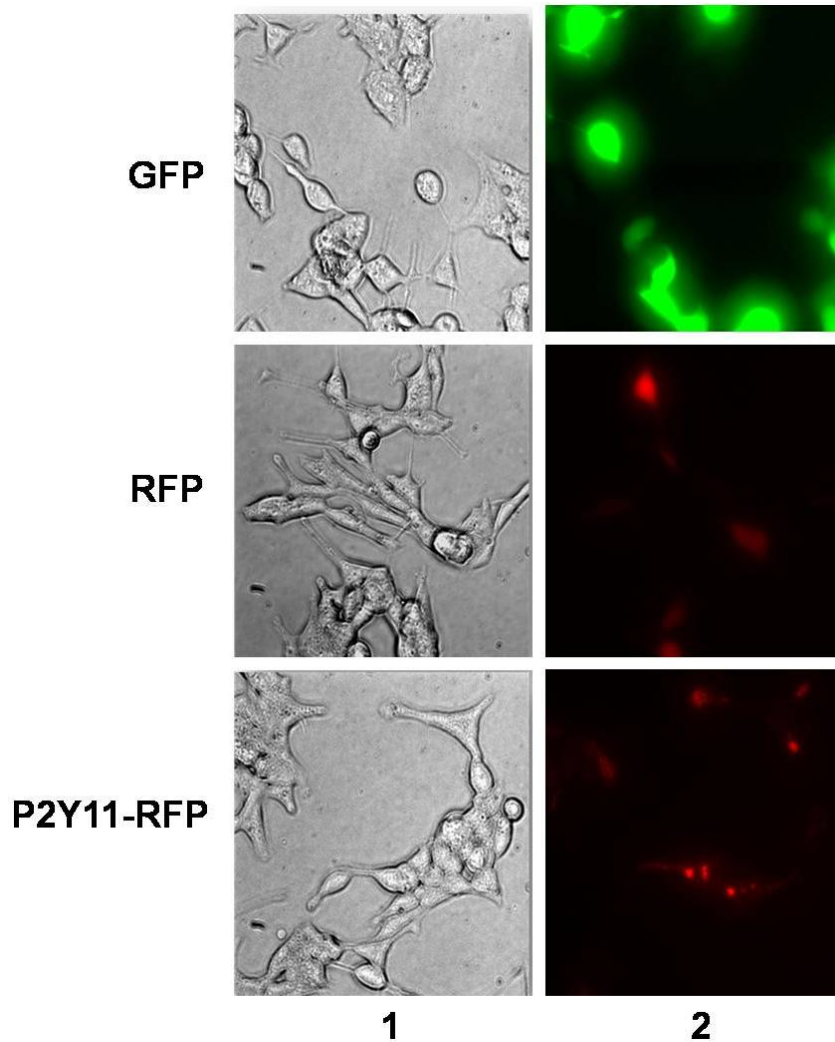


Figura 6. Expresión del receptor P2Y11-RFP en células AD293. Células AD293 fueron transfectadas con los plásmidos pEGFP-N1 (GFP), pDsRed-Monomer-N1 (RFP) y P2Y11-RFP por 24 horas. La columna 1 corresponde a imágenes tomadas por contraste de fases, la columna 2 corresponde a imágenes obtenidas por epifluorescencia.

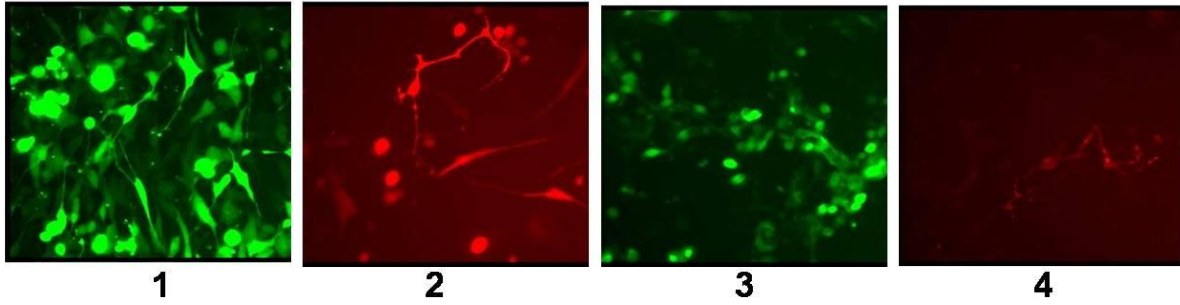


Figura 7. Imágenes obtenidas por epifluorescencia a partir de células 1321N1 transfectadas con los plásmidos GFP (1), RFP (2), P2Y4-GFP (3) ó P2Y11-RFP (4).

Las células 1321N1 fueron transfectadas con los plásmidos P2Y4-GFP, P2Y11-RFP y también cotransfectadas con estos plásmidos. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos al transfectar a las células con los plásmidos P2Y4-GFP o P2Y11-RFP. Como se observó previamente empleando el microscopio de epifluorescencia, las proteínas de fusión se distribuyen tanto en el citoplasma como en la membrana o en zonas cercanas a esta.

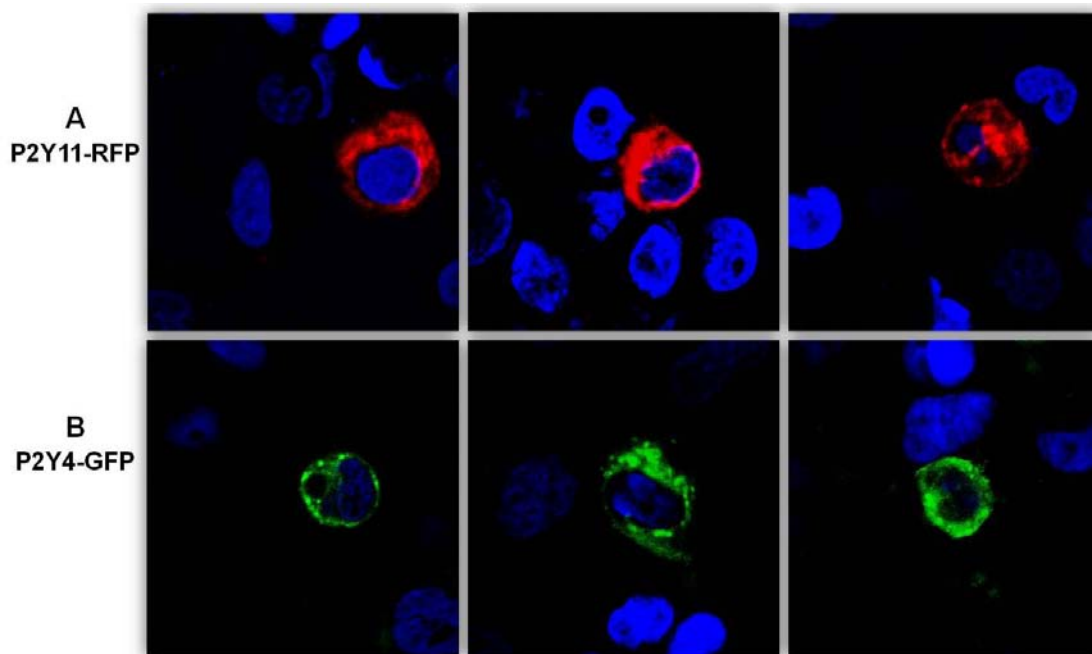


Figura 8. Expresión de las proteínas de fusión P2Y11-RFP ó P2Y4-GFP en células 1321N1. Se muestran 3 construcciones de imágenes obtenidas mediante microscopia confocal en diversos campos y tomadas cada 5 μ en coordenada Z. A) P2Y11-RFP ó B) P2Y4-GFP. DAPI en color azul.

Para corroborar esta observación, se realizaron cortes de 5 μ en coordenada Z iniciando desde la región más cercana al portaobjetos, las imágenes obtenidas apoyan lo observado previamente, además conforme se avanza hacia arriba en Z se logra apreciar también cierta expresión de ambas proteínas en el citoplasma (Figura 9).

Posteriormente analizamos las células cotransfectadas con los plásmidos P2Y4-GFP y P2Y11-RFP cuyas imágenes se encuentran en la figura 10. Como se puede observar si se analiza solo el canal rojo para identificar la localización del receptor P2Y11, esta proteína se localiza prácticamente en la membrana y muy poco en el citoplasma. Esta observación es contrastante cuando la célula es transfectada solamente con el plásmido P2Y11-RFP, donde se observa una mayor cantidad de proteína en el citoplasma. Cuando se analiza la imagen con el canal verde para seguir al receptor P2Y4 se observa que este se encuentra principalmente en la membrana, pero también se observan agregados en el citoplasma. Cuando se realiza el empalme de las imágenes, se observa cierto grado de colocalización entre las proteínas en la zona de la membrana.

En relación a los agregados del receptor P2Y4 que se observan en el citoplasma, estos no parecen colocalizar con el receptor P2Y11. Es importante notar que aparentemente la expresión del receptor P2Y4 es mayor en comparación con la del receptor P2Y11 si se considera el nivel de fluorescencia, sin embargo se debe recordar que la GFP es más brillante que la RFP y que esta podría ser la causa de esta diferencia de expresión aparente.

Sin embargo, es importante notar que todo el receptor P2Y11 que se observa en la membrana aparentemente está colocalizando con el receptor P2Y4, lo que eventualmente podría significar que estos receptores interactúan entre sí. Si existiera una interacción entre estos receptores, tal vez el receptor P2Y4 que no consiguió interactuar con el receptor P2Y11 no pudo ser transportado a la membrana y permaneció formando los agregados que se observan.

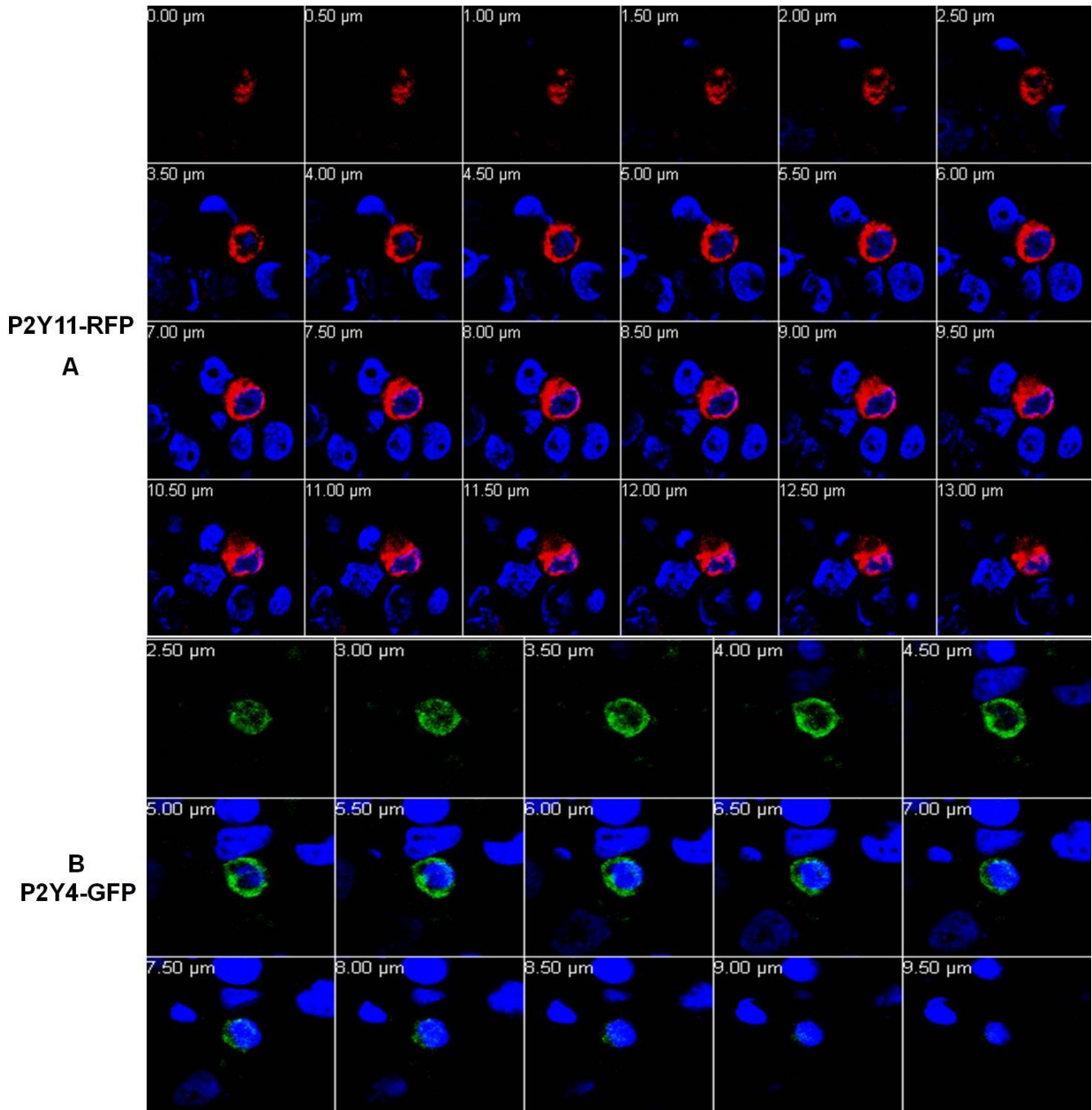


Figura 9. Expresión de las proteínas de fusión P2Y11-RFP ó P2Y4-GFP en células 1321N1. Se muestran rebanadas de imágenes, obtenidas mediante microscopia confocal, en el mismo campo cada 5 μ en coordenada Z. A) P2Y11-RFP ó B) P2Y4-GFP. DAPI en color azul.

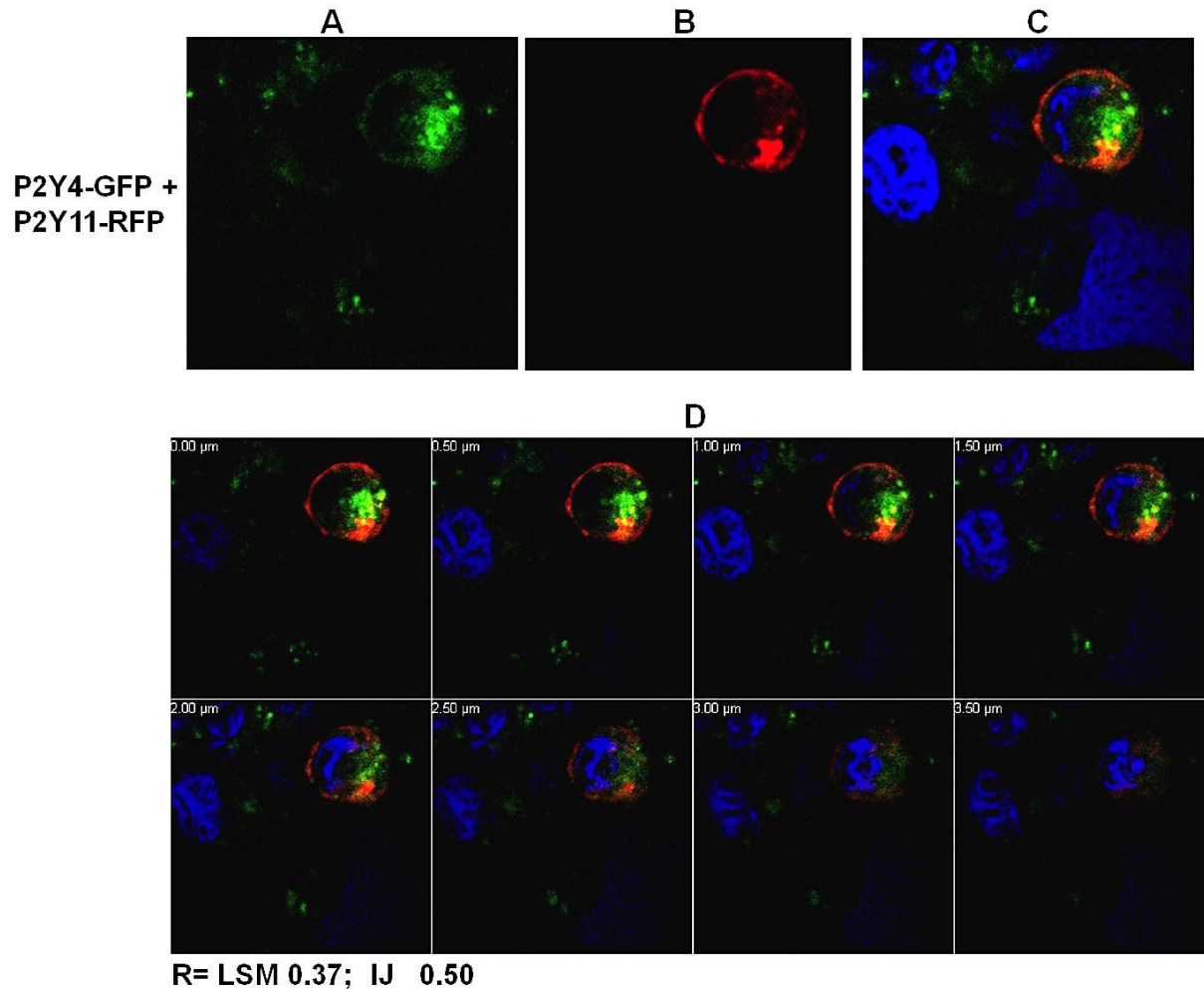


Figura 10. Expresión de las proteínas de fusión P2Y4-GFP y P2Y11-RFP en células 1321N1. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. A y B: GFP y RFP respectivamente; C: empalme de las fluorescencias GFP, RFP y DAPI; D: secuencia de los cortes obtenidos cada 5 μ en coordenada Z. R: coeficiente de correlación de Pearson obtenido mediante análisis estadístico con el uso de los programas AIM LSM 510 (LSM) e Image J (IJ), este coeficiente muestra el grado de colocalización sugerido.

Para descartar que el efecto observado cuando se coexpresan los receptores se debiera a la presencia de las proteínas fluorescentes, se cotransfectaron células 1321N1 con los plásmidos P2Y11-RFP+GFP ó P2Y4-GFP+RFP. Como se observa en la figura 11, las células transfectadas con ambas mezclas de plásmidos muestran cúmulos de las proteínas GFP o RFP pero también de los receptores acoplados a las proteínas fluorescentes. Sin embargo, es posible distinguir una porción del receptor en

la membrana plasmática, aparentemente menor que la que se observa cuando se coexpresan los receptores. Esta observación apoya la propuesta de que cuando los receptores P2Y4 y P2Y11 se encuentran presentes en la misma célula, se facilita su transporte a la membrana.

En el caso de la cotransfección de las proteínas P2Y11-RFP+GFP se observa una distribución en forma de agregados en ciertas zonas de la célula que no parecen corresponder a la membrana plasmática, al realizar el empalme de ambas fluorescencias se puede apreciar que la distribución de dichos agregados es similar, sin embargo las imágenes no sugieren una colocalización importante entre ambas proteínas.

Por otro lado al cotransfectar las proteínas P2Y4-GFP+RFP podemos observar algo similar a lo descrito anteriormente, sin embargo, en este caso la imagen obtenida mediante el empalme de ambas fluorescencias sugiere cierto grado de colocalización entre éstas.

Para determinar si las proteínas P2Y11 y P2Y4 heteromerizan, se decidió hacer un análisis por coimmunoprecipitación. Sin embargo, para poner a punto esta estrategia, era necesario primeramente establecer las condiciones para identificar a las proteínas, antes de ser inmunoprecipitadas. Ya que no se cuenta con anticuerpos que permitan identificar directamente las proteínas P2Y11 o P2Y4, se emplearon aquellos que reconocen las proteínas de fusión GFP y RFP. Para ello, extractos de células transfectadas con los plásmidos de interés por 48 h, fueron analizados por Western blot empleando los anticuerpos antes mencionados.

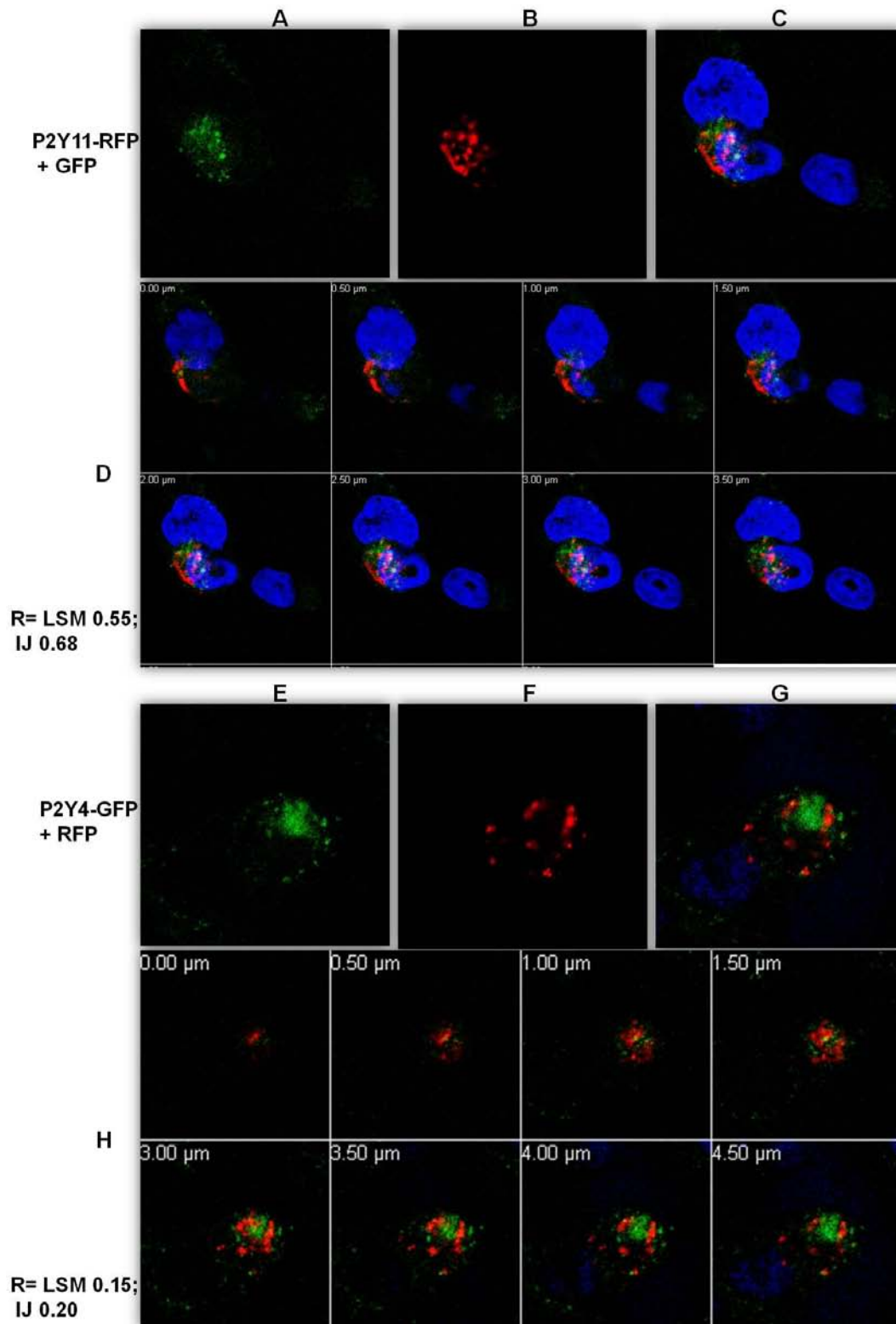


Figura 11. Expresión de las proteínas P2Y11-RFP+GFP (A-D) ó P2Y4-GFP+RFP (E-H) en células 1321N1. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. A,B y E,F: GFP y RFP respectivamente; C y G: empalme de las fluorescencias GFP, RFP y DAPI; D y H: secuencia de los cortes obtenidos cada 5 μ en coordenada Z; R: coeficiente de correlación de Pearson obtenido mediante análisis estadístico con el uso de los programas AIM LSM 510 (LSM) e Image J (IJ), este coeficiente muestra el grado de colocalización sugerido.

Como se muestra en la figura 12, el carril 4 donde se depositó el extracto de las células transfectadas con el plásmido pDs-Red monómero permite identificar una banda correspondiente al peso molecular de la RFP. Sin embargo, en los carriles donde se depositaron los extractos de las células transfectadas con los plásmidos codificantes de las proteínas de fusión, no se pudo distinguir ninguna proteína que correspondiera con el peso esperado. Lo mismo ocurrió cuando se realizó el ensayo de coimmunoprecipitación. Este resultado negativo no permitió aportar evidencias a favor de la interacción de los receptores.

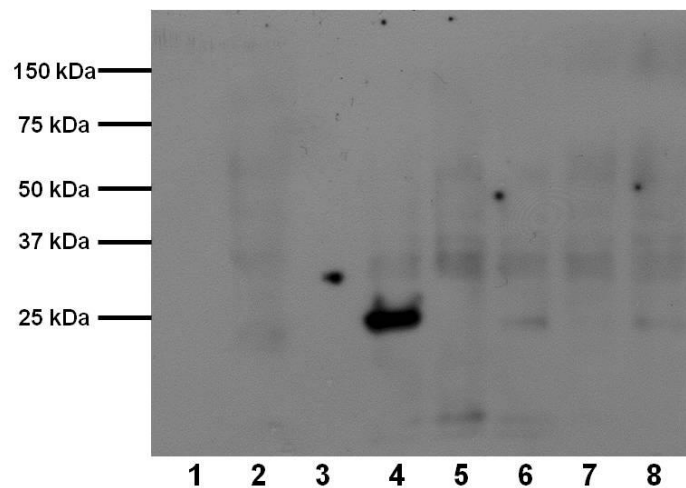


Figura 12. Western blot realizado a partir del lisado de células AD293. 1) Marcador de peso molecular; 2) extracto de células sin transfectar; 4) extracto de células transfectadas con el plásmido RFP; 7 y 8) extracto de células expresando las proteínas de fusión P2Y11-RFP o P2Y11-RFP+P2Y4-GFP respectivamente.

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo estuvo dirigido a entender la posible interacción entre los receptores purinérgicos P2Y4 y P2Y11, a través del uso de proteínas de fusión entre los receptores y las proteínas fluorescentes verde y roja. Empleando microscopía de epifluorescencia y confocal se obtuvo evidencia que sugiere que estas proteínas se colocan en la membrana plasmática de células transfectadas con los plásmidos que codifican para las proteínas de fusión, aunque también puede observarse que la fluorescencia se localiza en el citoplasma.

Cuando se observan las células que coexpresan a los receptores, es posible sugerir que se estos colocan en la membrana, y que su presencia en esta estructura es más evidente en comparación con la expresión de receptores de manera individual.

Lo anterior nos permite sugerir que la coexpresión es crucial para que ambas proteínas sean acarreadas a la membrana plasmática para formar una estructura heteromérica. En el caso de otros GPCRs, se ha reportado que la dimerización se lleva a cabo en el retículo endoplásmico inmediatamente después de la síntesis de los receptores y parece ser un requisito primordial para su correcta localización en la membrana plasmática (Ellgaard y Helenius, 2003; Bulenger *et al.*, 2005). Incluso se ha sugerido que la dimerización en los primeros estadios de la síntesis de GPCRs es requerida para el correcto plegamiento y maduración del receptor y que estas estructuras son estables y pueden permanecer hasta el momento de la destrucción de las proteínas (Trombetta y Parodi, 2003; Milligan *et al.*, 2005; Herrick-Davis *et al.*, 2006; López-Gimenez *et al.*, 2007; Canals *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.* 2010; Cunningham *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2013).

Hay varias líneas de evidencia sugiriendo que la dimerización de los receptores ocurre antes de que estos alcancen la membrana plasmática. Uno de los ejemplos más claros de lo anterior, es el caso de la heteromerización de los receptores GABABR1 y GABABR2 la cual es requerida para que los receptores se transporten del retículo

endoplásmico a la membrana plasmática (Jones *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). Por lo tanto, la dimerización ha sido propuesta como un mecanismo general necesario para el tráfico adecuado de los receptores acoplados a proteínas G hacia la membrana plasmática. Sin embargo, hasta el momento no se sabe con total seguridad si los receptores purinérgicos son sintetizados como monómeros, integrados en la membrana plasmática y posteriormente oligomerizados dentro de una estructura cuaternaria, si estos procesos se llevan a cabo al mismo tiempo o si estas cadenas peptídicas se forman de GPCRs individuales que se empiezan a oligomerizar mientras aún están asociados al ribosoma. Lo que si se ha demostrado es que la oligomerización puede ser constitutiva y llevarse a cabo en etapas tempranas del proceso biosintético (Salahpour *et al.*, 2004).

Una evidencia que apoya nuestra propuesta sobre la formación de heterómeros entre los receptores P2Y4 y P2Y11, es la mostrada por D'Ambrosi y colaboradores en 2007 al trabajar con otros receptores P2Y. Estos autores observaron que la heteromerización entre los receptores P2Y4 y P2Y6 ocurre de manera nativa en neuronas, además de que se sabe que tanto P2Y4 como P2Y6 poseen dominios que podrían permitir la asociación con otros P2Y como el 1,2,4,6 y 11 (Nakata *et al.*, 2010).

Además de la localización de los receptores P2Y4-GFP y P2Y11-RFP en la membrana, también se distingue la formación de cúmulos de fluorescencia en el citoplasma siendo más abundante la señal que corresponde a la proteína P2Y4-GFP. En estos cúmulos se observa una colocación de fluorescencias, pero también se observa una proporción importante de cúmulos donde solo se distingue a la proteína P2Y4-GFP.

La naturaleza de agregados como los que observamos se desconoce, sin embargo, hay evidencia que muestra que la mayor proporción de receptores no se encuentra en la membrana plasmática sino en almacenamientos internos (Hein *et al.*, 1994; Brismar *et al.*, 1998; Achour *et al.*, 2008). Los receptores pueden ser movilizados

de estos reservorios después de un estímulo externo que favorece su unión con componentes de las vías secretoras o bien a través de su unión con algún ligando endógeno, sin embargo hay poca información sobre los mecanismos implicados en la retención de los receptores en el interior celular. Por lo tanto no podemos llegar a una conclusión clara con respecto a los agregados que observamos en nuestros resultados.

Una posible explicación de lo que observamos puede ser que si la cantidad de proteína P2Y4-GFP producida en la células que coexpresan los receptores es mayor que la de la proteína P2Y11-RFP, entonces la primera queda libre y no logra llegar a la membrana por lo que se acumula en el citoplasma. Si la interacción entre los receptores P2Y4 y P2Y11 es crucial para dirigir el heterómero a la membrana, y en este caso existe un exceso del receptor P2Y4, probablemente este último se agregue y forme péptidos pequeños en el proteasoma para posteriormente ser degradados (Simms- Waldrip *et al.*, 2008).

Con respecto a lo anterior, se utiliza el término proteostasis para definir a la homeostasis proteínica, el objetivo de la proteostasis es evitar el desdoblamiento de las proteínas y la formación de agregados no funcionales (Triana-Martínez *et al.*, 2012). En efecto, existe un complejo conocido como proteasoma el cual está localizado en el citoplasma y el núcleo y cuyo objetivo es degradar proteínas no necesarias o dañadas (Simms-Waldrip *et al.*, 2008). Además, se sabe que existen otros sitios específicos para la acumulación de agregados de proteínas, a estos sitios se les ha denominado agregosoma que es una estructura que contiene componentes del proteasoma, se ha reportado que este sistema no se encuentra de manera permanente en la célula pero que puede encontrarse cuando los sistemas de eliminación de la misma se encuentran alterados (Kawaguchi *et al.* 2003). Además, se ha demostrado que cuando ciertas proteínas mal plegadas no se pueden reparar y la degradación de las mismas no ocurre inmediatamente, éstas interactúan con otras proteínas mal plegadas y forman agregados, posteriormente los agregados son destruidos a través de la ruta del agregosoma (Simms- Waldrip *et al.*, 2008).

Los anteriores son mecanismos que posee la célula para mantener la proteostasis y con ello su correcto funcionamiento, con este concepto Balch y colaboradores (2008), han propuesto al límite de la proteostasis como el equilibrio entre las proteínas que se sintetizan y las que se degradan. Es posible que la formación de agregados observados en nuestros resultados sean debido a alguno de los mecanismos mencionados anteriormente y cuya finalidad sea procesar el exceso de la proteína P2Y4-GFP.

Cuando se trató de identificar a las proteínas de fusión por Western blot y por inmunoprecipitación a partir del extracto de células transfectadas, no se logró ver ninguna señal aún cuando la fluorescencia era evidente en las células transfectadas, lo que sugiere que estas proteínas podrían ser degradadas muy rápidamente, de manera alternativa, es probable que su heteromerización sea regulada por algún otro factor, incluyendo su misma activación por el agonista tal y como ha sido demostrado en otros tipos de GPCRs.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran una clara relocalización de ambas proteínas cuando se encuentran coexpresadas además de cierto grado de colocación entre ellas en comparación con lo observado cuando las proteínas se expresan de forma independiente. Es sugerente que existe una interacción entre ambas proteínas y que ésta puede ser de tipo funcional, la idea anterior puede sustentarse o apoyarse con la realización de mas experimentos.

FIGURAS.

FIGURA 4. OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL RECEPTOR P2Y4 POR PCR.....	24
FIGURA 5. CLONACIÓN DEL FRAGMENTO CODIFICANTE DEL RECEPTOR P2Y11	25
FIGURA 6. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2Y11-RFP EN CÉLULAS AD293.....	27
FIGURA 7. IMÁGENES OBTENIDAS POR EPIFLUORESCENCIA A PARTIR DE CÉLULAS 1321N1 TRANSFECTADAS CON LOS PLÁSMIDOS GFP, RFP, P2Y4-GFP Ó P2Y11-RFP.	28
FIGURA 8. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN P2Y11-RFP Ó P2Y4-GFP EN CÉLULAS 1321N1.	28
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN P2Y11-RFP Ó P2Y4-GFP EN CÉLULAS 1321N1..	30
FIGURA 10. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN P2Y4-GFP Y P2Y11-RFP EN CÉLULAS 1321N1..	31
FIGURA 11. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS P2Y11-RFP+GFP Ó P2Y4-GFP+RFP EN CÉLULAS 1321N1.....	35
FIGURA 12. WESTERN BLOT REALIZADO A PARTIR DEL LISADO DE CÉLULAS AD293.	35

10. REFERENCIAS

- Achour L, Labbe-Juillie C, Scott MGH, Marullo S. 2008. An escort for G Protein Coupled Receptors to find their path: implication for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29: 528–535.
- Algaier I, Jakubowski JA, Asai F, vonKügelgen I. 2008. Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y12 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 6: 1908–1914.
- Arellano RO, Miledi R. 1993. Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Journal of General Physiology*. 102:833–857.
- Arellano RO, Woodward RM, Miledi R. 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Ion Channels*. 14:203-59.
- Arellano RO, Garay E, Miledi R. 1998. Cl currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 274:C333–C340.
- Balch W, Morimoto R, Dillin A, Kelly J. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319:916–919.
- Boehm S, Kubista H. 2002. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacology Review*. 54:43–99.
- Brismar H, Asghar M, Carey RM, Greengard P, Aperia A. 1998. Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 5573–5578.
- Boehm S, Kubista H. 2002. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev*. 54 (1): 43-99.
- Bulenger S, Marullo S, Bouvier M. 2005. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 26:131–137.

- Canals M, Lopez-Gimenez JF, Milligan G. 2009. Structural re-organization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective alpha(1b)-adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers. *Biochemistry Journal*. 417(1):161-172.
- Carriba DP (2007). Heteromerización de Receptores de Adenosina A2A, Dopamina y Cannabinoides CB1. Implicaciones Farmacológicas y Funcionales. Revisada por Dr Carme Lluís Biset y Dr Vicent Casadó. Tesis doctoral inédita. Universidad de Barcelona. Facultad de Biología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- Ciruela F, Fernández-Dueñas V, Llorente J, Borroto-Escuela D, Cuffí ML, Carbonell L, Sánchez S, Agnati LF, Fuxe K, Tasca CI. 2012. G protein-coupled receptor oligomerization and brain integration: Focus on adenosinergic transmission. *Brain Research*. 1476:86-95.
- Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, Robaye B, Boeynaems JM. 2000. Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signalling*. 12(6):351-360.
- Cunningham MR, McIntosh KA, Padiani JD, Robben J, Cooke AE, Nilsson M, Gould GW, Mundell S, Milligan G, Plevin R. 2012. Novel role for proteinase-activated receptor 2 (PAR2) in membrane trafficking of proteinase-activated receptor 4 (PAR4). *Journal of Biological Chemistry* 11;287(20):16656-16669.
- Cvejic S, Devi LA. 1997. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 26959–26964.
- D'Ambrosi N, Iafrate M, Saba E, Rosa P, Volonté c. 2007. Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768: 1592–1599.
- Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. 2003. Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood*. 101: 3908–3914.

- Dubyak GR, el-Moatassim C. 1993. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *American Journal of Physiology*. 265: C577-606.
- Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schäfer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G. 2008. Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. *Biochemistry Journal*. 409: 107–116.
- Ellgaard L, Helenius A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 4:181–191.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Archives - European Journal of Physiology*. 452: 552–562.
- Eugenin EA, Basilio D, Sáez JC, Orellana JA, Raine CS, Bukauskas F, Bennett MV, Berman JW. 2012. The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system. *Journal of Neuro Immune Pharmacology* 7:499-518.
- Franco N and Franco R. 2014. Understanding the Added Value of G-Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Scientifica*. Article ID 362937.
- Hein L, Ishii K, Coughlin SR, Kobilka BK. 1994. Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 27719–27726.
- Herrick-Davis K, Weaver BA, Grinde E, Mazurkiewicz JE. 2006. Serotonin 5-HT2C receptor homodimer biogenesis in the endoplasmic reticulum: real-time visualization with confocal fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry* 15;281(37):27109-27116.
- Hillmann P, Ko GY, Spinrath A, Raulf A, von Kügelgen I, Wolff SC. 2009. Key determinants of nucleotide-activated G protein-coupled P2Y2 receptor function revealed by chemical and pharmacological experiments, mutagenesis and homology modeling. *Journal of Medicinal Chemistry*. 52: 2762–2775.

- Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA. 1999. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 14639–14647.
- Jala VR y Haribabu B. 2006. Real-Time Analysis of G Protein-Coupled Receptor Signaling in Live Cells. En: *Methods in Molecular Biology*. Ed. Walker JM. 332: 159-166.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M. 1998. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*. 396: 674–679.
- Kawaguchi Y, Kovacs J, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115: 727–738.
- Kobayashi NR, Hawes SM, Crook JM, Pébay A. 2010. G-protein coupled receptors in stem cell self-renewal and differentiation. *Stem Cell Reviews*. 6(3):351-366.
- Kim B, Jeong HK, Kim JH, Lee SY, Jou I, Joe EH. 2011. Uridine 5'-diphosphate induces chemokine expression in microglia and astrocytes through activation of the P2Y6 receptor. *J Immunol*. 186 (6): 3701-9.
- Lopez-Gimenez JF, Canals M, Pediani JD, Milligan G. 2007. The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Molecular Pharmacology*. 71(4):1015-1029.
- Lutz S, Friechel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, Wieland T. 2005. The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and Rho. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 1134-1139.
- Maroto R, Hamill OP. 2001. Brefeldin a block of integrin dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel

mechanism of mechano transduction. *Journal of Biological Chemistry* 76:23867-23872.

- Milligan G, Wilson S, López-Gimenez JF. 2005. The specificity and molecular basis of alpha1-adrenoceptor and CXCR chemokine receptor dimerization. *Journal of Molecular Neuroscience*. 26(2-3):161-168.
- Nakata H, Yoshioka K, Kamiya T, Tsuga H, Oyanagi K. 2005. Functions of Heteromeric Association Between Adenosine and P2Y Receptors. *Journal of Molecular Neuroscience*. 26: 920-940.
- Nakata H, Suzuki T, Namba K, Oyanagi K. 2010. Dimerization of G protein-coupled purinergic receptors: increasing the diversity of purinergic receptor signal responses and receptor functions. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 30(5):337-346.
- Oyanagi K, Kamiya T, Nakata H. 2006. Heterodimerization of purinergic receptors in human platelet membranes. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract A11190.
- Parker MS, Park EA, Sallee FR, Parker SL. 2011. Two intracellular helices of G-protein coupling receptors could generally support oligomerization and coupling with transducers. *Amino Acids*. 40:261–268.
- Rangel-Yescas GE, Vazquez-Cuevas FG, Garay E, Arellano RO. 2012. Cloning and functional analysis of P2X1b, a new variant in rat optic nerve that regulates the P2X1 receptor in a use-dependent manner. *Acta Neurobiologia e Experimentalis (Wars)*. 72:18-32
- Redegeld FA, Caldwell CC, Sitkovsky MV. 1999. Ecto-protein kinases: ecto domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation?. *Trends in Pharmacological Sciences*. 20:453-459.
- Retama 2006 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:GPCR.png#filehistory>.

- Romano C, Yang WL, L. O'Malley K. 1996. Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Disulfide-linked Dimer. *The Journal of Biological Chemistry*. 45: 28612-28616.
- Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S, Bouvier M. 2004. Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *Journal of Biological Chemistry*. 279:33390–33397.
- Saldaña C, Garay E, Rangel GE, Reyes LM, Arellano RO. 2009. Native ion current coupled to purinergic activation via basal and mechanically induced ATP release in *Xenopus* follicles. *Journal of Cellular Physiology*. 218: 355-365.
- Schicker K, Hussl S, Chandaka GK, Kosenburger K, Yang JW, Waldhoer M, Sitte HH, Boehm S. 2009. A membrane network of receptor and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1793: 325–334.
- Simms-Waldrup T, Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, Fu C, Sakamoto KM. 2008. The aggresome pathway as a target for therapy in hematologic malignancies. *Molecular Genetics and Metabolism*. 94(3):283-286.
- Szidonya L, Cserzo M, Hunyady L. 2008. Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *Journal of Endocrinology*. 196: 435–453.
- Triana-Martínez F, Gómez-Quiroz LE, Königsberg Fainstein M. 2012. El flujo de la Información y la Proteostasis: Consecuencias Fisiológicas. *REB* 31(4): 136-144.
- Trombetta ES y Parodi AJ. 2003. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 19:649–676.
- Von Kügelgen I, Späth L, Starke K. 1992. Stable adenine nucleotides inhibit [³H]-noradrenaline release in rabbit brain corte slices by direct action at presynaptic adenosine A1-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. 346: 187–196.
- Ward RJ, Xu TR, Milligan G. 2013. GPCR oligomerization and receptor trafficking. *Methods in Enzymology*. 521:69-90.

- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. 1998. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*. 396: 679–682.
- White PJ, Webb TE, Boarder MR. 2003. Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors evidence for agonist-specific signaling. *Molecular Pharmacology*. 63: 1356–1363.
- Yoshioka K, Nakata SH. 2001. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 7617–7622.
- Zentella DA, Alcántara HR. 2003. Importancia de los Dominios de Interacción Proteica en la Formación de Complejos en los Sistemas de Transducción. *REB* 22(3): 117-129.