

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Expresión del receptor V1b de vasopresina de rata acoplado a la proteína amarilla fluorescente (YFP) en células polarizadas (MDCK)

2. INTRODUCCION

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

Profesor Patrocinante : Sr. Carlos B. González F. – Instituto de Fisiología – Facultad de Medicina.

Carolina Ivonne Villanueva Mohr

Valdivia Chile 2004

Contenido

Dedicatoria .

Agradecimientos .

LISTA DE ABREVIATURAS .

1. RESUMEN .

2. INTRODUCCION .

1

3. MATERIALES Y METODOS .

4. RESULTADOS . .

5. DISCUSION .

BIBLIOGRAFIA .

2. INTRODUCCION

La hormona arginina (Arg⁸) vasopresina (AVP), es un nonapéptido cíclico compuesto por nueve residuos aminoacídicos y un puente disulfuro entre las Cys 1 y 6 (Du Vigneaud, 1954). En mamíferos es sintetizada como prohormona junto a su neurofisisina respectiva (Ritcher, 1983), principalmente en las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo y es liberada a la circulación sistémica en el lóbulo neural de la hipófisis (Pickering et. al., 1983). A su vez, AVP, es también liberada dentro del sistema nervioso central mediante prolongaciones axonales que nacen en los núcleos hipotalámicos y que se proyectan a distintas regiones del cerebro. El control fisiológico de la síntesis y liberación de AVP es regulado por cambios en la osmolaridad plasmática, lo cual es detectado por osmorreceptores especializados ubicados en la región del hipotálamo anterior (Thrasher et. al. 1982; Yang et. al. 1994).

Esta hormona a nivel periférico ejerce diferentes efectos biológicos, en el riñón regula el balance de solutos y agua, participa además, en la contracción de la musculatura lisa vascular, agregación plaquetaria, glicogenólisis hepática y secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). A nivel cerebral actúa como neurotransmisor en varias respuestas fisiológicas tales como termorregulación y modulación del aprendizaje y memoria (Grazzini et. al., 1996).

Los efectos biológicos de esta hormona están mediados por una familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), que poseen siete dominios de transmembrana hidrofóbicos alternados por dominios intra y extracelulares, además de un amino terminal extracelular y un carboxilo terminal citoplasmático (Jard et. al., 1986).

Tres subtipos de receptores de vasopresina han sido identificados sobre la base de sus diferentes perfiles farmacológicos y funcionales los que han sido denominados V1a, V1b ó V3 y V2 (Jard et. al., 1986).

El receptor V2 se expresa predominantemente en las células principales del túbulo colector renal, donde controla la liberación y reabsorción de agua y urea vía la estimulación de adenilatociclasa (Thibonnier et. al., 1994). Se han clonado en la última década los receptores V2 de rata (Lolait et. al., 1992) y humano (Birnbauer et. al., 1992), como también el V2 de ratón, cerdo y bovino (Oksche et. al., 2002). El cDNA del receptor V2 presenta una secuencia nucleotídica de 1.222 pb, que codifica para una proteína de 370 aminoácidos ($M_R = 40.518$). Posee dos sitios putativos de N-glicosilación en el extremo amino terminal extracelular y numerosos sitios de fosforilación en la región carboxilo terminal de la proteína (Lolait et. al., 1992).

La unión de AVP al receptor V2 estimula adenilatociclasa, produciendo aumento de AMPc y una posterior activación de proteína Kinasa A (Birnbauer, 2000) induciendo la inserción de vesículas que contienen aquaporina 2 en la membrana apical, permitiendo de esta forma la reabsorción de agua en las células principales en el túbulo colector renal (Laycock, et. al., 1998).

Por otra parte el receptor V1a también conocido como V1a vascular / hepático, se encuentra más ampliamente difundido, encontrándose presente en la musculatura lisa vascular, hepatocitos, plaquetas, linfocitos, monocitos, neumocitos tipo II, en la corteza adrenal, cerebro (hipocampo, septum, y amígdalas), órganos reproductivos, epitelio renal, células renales mesangiales, produciendo en estos tejidos contracción y proliferación celular, agregación plaquetaria, aumento de los factores de coagulación y la glicogenólisis (Thibonnier et. al., 1994).

En los últimos tiempos se ha clonado el receptor V1a de hígado de rata (Morel et. al., 1994) hígado de humano (Howl et. al., 1991). El cDNA del receptor V1a de hígado de rata posee una secuencia nucleotídica de 1.354 pb que codifica para una proteína de 394 aminoácidos con una masa molecular aparente de 44.202 Da. Este receptor presenta dos sitios putativos de N-glicosilación en el extremo amino terminal extracelular y numerosos sitios potenciales de fosforilación localizados en el tercer dominio intracelular y en la región carboxilo terminal, lo que sugiere que la función del receptor es regulada por proteínas kinasas (Morel et. al., 1992). Thibonnier y colaboradores clonaron en 1994 el cDNA del receptor V1a de hígado humano encontrando una secuencia nucleotídica de 1.472 pb que codifica para una proteína de 418 aminoácidos.

Estudios farmacológicos y bioquímicos desarrollados en cultivos primarios de pituitaria de rata han mostrado la existencia de un receptor específico de pituitaria para la liberación de AVP relacionado con el receptor V1 (Antonni et. al., 1988). Este receptor es, sin embargo, farmacológicamente distinto al receptor V1a presente en hígado, cerebro, médula adrenal y musculatura lisa vascular. Es por ello que se ha denominado V1b ó V3. El receptor V1b ha sido localizado en las células corticotropas de la pituitaria anterior de humanos y ratas (Antonni et. al., 1984; 1988; DuPasquier et. al., 1991) donde media la secreción de ACTH. También se ha observado que es expresado en menor grado en algunas áreas discretas del cerebro y algunas células endocrinas (Burbach et. al., 1992;

Lolait et. al., 1995; Richardson et. al., 1995 y Grazzini et. al., 1996). También se ha encontrado en algunos tejidos periféricos como riñón, timo, corazón, pulmón, bazo, útero y mamas (Lolait et. al., 1997).

En rata, el gen del receptor V1b presenta tres exones y dos intrones, un primer intrón corto de 161 pb similar al descrito para el receptor de oxitocina y un segundo intrón de aproximadamente 9 Kb que está ubicado en el final del sexto dominio de transmembrana, lo cual es característico de otros receptores de esta familia (Rozen et. al., 1995; Thibonnier et. al., 1996 y Ventura et. al., 1999). Parte del segundo exón codifica para los primeros seis dominios de transmembrana y parte del tercer exón codifica para el séptimo dominio de transmembrana (Aguilera et. al., 2003).

En la última década se han clonado dos tipos de cDNA del V1b de hipófisis de rata. Saito y colaboradores en 1995 clonó el receptor V1b obteniendo una secuencia nucleotídica de 1.275 pb que codifica para una proteína de 425 aminoácidos, con una masa molecular aparente de 47.031 Da. Por otra parte, Lolait y colaboradores en 1995 clonaron el cDNA de hipófisis de rata del receptor V1b obteniendo una secuencia nucleotídica de 1.263 pb que codifica para una proteína de 421 aminoácidos de una masa molecular aparente de 46.683 Da. En tanto, el cDNA del V1b de hipófisis de humano (Keyzer et. al., 1994; Sugimoto et. al., 1994) presenta 1.272 pb y codifica para una proteína de 424 aminoácidos que presenta una masa molecular aparente de 46.947 Da (Keyzer et. al., 1994).

El receptor V1b de vasopresina presenta un sitio de N-glicosilación (Asn²¹) en el dominio N-terminal extracelular y potenciales sitios de fosforilación para proteína kinasa A en Thr³⁷⁵, proteína kinasa C en Thr³⁸⁵ y caseína kinasa en Ser⁴⁰³ en la región C-terminal intracelular. Presenta un número alto de residuos conservados, como por ejemplo, Cys¹⁰⁷ y Cys¹⁸⁶ en el segundo y tercer dominio extracelular con los cuales puede formar un puente disulfuro requerido para la estructura del receptor, además, dos potenciales sitios de palmitoilación en Cys³⁵² y Cys³⁵³ en el extremo C-terminal intracelular que pueden estar envueltas en el anclaje del receptor a la membrana plasmática (Lolait et. al., 1995).

La unión de AVP a los receptores tipo V1 (V1a y V1b), produce la activación de una proteína denominada Gq/11 que activan a su vez a fosfolipasa C, la cual es una enzimas específicas de fosfoinositol, encargadas de degradar el fosfoinositol bisfosfato (PIP₂), generando inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol. Varios estudios han demostrado la existencia de una variedad de vías de señalización asociadas al receptor V1a expresado endógenamente en el tejido o líneas celulares. Estos incluyen activación de fosfolipasa A2 y D que incrementan el calcio intracelular y permite la acidificación celular a través de la activación de la bomba Na⁺/H⁺ (Briley et. al., 1994).

El IP₃, pequeña molécula hidrosoluble, difunde por todo el citosol y gatilla dentro de la célula la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático, al unirse a canales de Ca²⁺. Por otra parte, el diacilglicerol puede ser degradado a ácido araquidónico que puede actuar como mensajero o ser utilizado en la síntesis de eicosanoides. Por otro lado, el diacilglicerol activa a una proteína serina/treonina kinasa denominada proteína kinasa C produciendo fosforilación de proteínas (Thibonnier et. al., 1994; Alberts et. al.,

1996).

El estudio del tráfico y destino intracelular de GPCR es importante puesto que la función de la cascada de transducción de señales, requiere de la correcta distribución de las proteínas que participan en ella (Schülein et. al., 1998). Un modelo ampliamente utilizado en el estudio del correcto tráfico de proteínas de membrana son las células epiteliales polarizadas (Rodríguez-Boulan y Gonzalez, 1999). Estas células forman una barrera que separa compartimentos biológicos y que regula la homeostasis a través del control del transporte de iones y solutos desde los distintos compartimentos.

La membrana de células epiteliales polarizadas presenta un dominio apical y un dominio basolateral separados por “*tight junction*” o uniones estrechas. Cada dominio está compuesto por distintos tipos de proteínas y lípidos, permitiéndole de este modo cumplir diversas funciones biológicas (Lipardi et. al., 2002; Roush et. al., 1998). En el caso particular de los GPCRs heptahélices, éstos han sido ubicados tanto en el dominio apical como basolateral de células epiteliales (Hermosilla et. al., 2001).

El mantenimiento de la asimetría de las proteínas en los distintos dominios de membrana, es realizado por un continuo tráfico de las proteínas recién sintetizadas, desde el *Trans-Golgi Network* (TGN) a la membrana plasmática por medio de vesículas. Este tráfico puede ocurrir por dos vías, directa o indirecta. En la vía directa las proteínas recién sintetizadas son transportadas desde el TGN a uno de los dominios de membrana ya sea apical o basolateral. Un ejemplo es lo que ocurre con los receptores α_{2A} y α_{2C} adrenérgicos, que son distribuidos directamente a la membrana basolateral (Keefer et. al., 1994; Wozniak et. al., 1996). Por el contrario, en la vía indirecta o transcitosis, las proteínas son primero enviadas desde el TGN a un dominio desde el cual son endocitadas y transportadas a la superficie opuesta. Es el caso del receptor de polinmunoglobulinas (pIgR) éste es endocitado desde el dominio basolateral y transportado al dominio apical (Lipardi et. al., 2002; Keller et. al., 1997 y Sarnataro et. al., 2000).

Se han identificado señales de distribución apical y basolateral, sin embargo, la correcta distribución de las proteínas de membrana parece depender del correcto balance entre las señales apicales y basolaterales (Nelson y Yeaman, 2001; Matter y Mellman, 1994). Dentro de las señales de distribución basolateral encontramos los motivos que contienen tirosina como es YXXØ (donde X representa cualquier aminoácido y Ø cualquier aminoácido con un grupo hidrofóbico) importante en la mediación de la endocitosis por clatrina (Bonifacino y Dell’angelica, 1999). Otra señal de distribución basolateral característica es el motivo di-leucina (Hunziker y Fumey, 1994; Mirande et. al., 2001). Por otra parte se han identificado microdominios de membrana enriquecidos en esfingolípidos y colesterol conocidos como *rafts* o balsas lipídicas que cumplen un rol en la distribución hacia la superficie apical (Simons e Ikonen, 1997). Algunas de las proteínas que se encuentran en la superficie apical presentan glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Brown y Rose, 1992). También se ha descrito que la presencia de N y O-glicanos en el dominio luminal de las proteínas promueve la distribución apical posiblemente debido a interacciones con lectinas en el TGN que inducen a la proteína a dirigirse a la superficie apical (Fiedler et. al., 1994). La retención y distribución de proteínas juega un rol crucial en el mantenimiento de la polaridad celular, por ejemplo, la cola citoplasmática

de varias proteínas que se encuentran en la superficie basolateral contienen dominios de unión a PDZ los cuales interactúan con proteínas PDZ citosolicas, reteniéndola en la membrana (Fanning y Anderson, 1999).

Se han realizado numerosos estudios de tráfico y distribución subcelular de GPCR utilizando como modelo células epiteliales polarizadas, un ejemplo de ello son, los receptores α_{2A} (Keffer y Limbird, 1993), α_{2B} , α_{2C} adrenérgico (Woznaok y Limbird, 1996), al igual que el receptor de la hormona estimulante de la tiroide (TSH), el receptor de la hormona folículo estimulante (FSH) y el receptor de la hormona luteinizante LH (Beau et. al., 1997) y el receptor purinérgico P2Y₁₁ (Zambon et. al., 2001) los cuales se expresan en el dominio basolateral de la célula. Por el contrario, en el dominio apical ha sido observado el receptor A1 de adenosina (Saunders et. al., 1996) y el receptor de rodopsina (Chuang y Sung, 1998).

En el caso particular de los receptores de vasopresina, se ha establecido que los receptores V1a (Campos et. al., 2001) y V2 (Shülein et. al., 1998; Andersen-Beckh et. al., 1999) de vasopresina se localizan en la membrana basolateral de células polarizadas. Estudios recientes han mostrado la presencia de señales de distribución basolateral en el segundo dominio intracelular del receptor V2, prevaleciendo frente a las señales apicales encontradas en el carboxilo terminal (Hermosilla y Schülein, 2001). Por el contrario, en el receptor V1a se han descrito en el C-terminal motivos hidrofóbicos tal como Leu-Leu que podrían estar envueltos en el destino a la membrana basolateral (Campos et. al., 2001). Es por ello, que como objetivo general de esta tesis se ha considerado de interés estudiar la distribución subcelular del receptor V1b de hipófisis de rata en células epiteliales polarizadas (MDCK), un modelo de estudio bien caracterizado, utilizando proteína amarilla fluorescente (YFP), una variante de la *Aequorea victoria green* (GFP) como marcador molecular del monitoreo de proteínas.

Como hipótesis de este trabajo se planteó que el receptor V1b acoplado a la proteína YFP presenta una distribución basolateral en células polarizadas y conserva las características funcionales similares al receptor V1b nativo.

Para determinar la validez de la hipótesis planteada se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Clonar el fragmento codificante del receptor V1b de vasopresina desde hipófisis de rata.
2. Subclonar el fragmento codificante del receptor V1b de vasopresina acoplado a la proteína amarilla fluorescente (YFP)
3. Expresar de forma estable el receptor V1bYFP en células epiteliales polarizadas MDCK.
4. Realizar ensayos funcionales del V1bYFP.
5. Determinar la localización subcelular del receptor V1b de vasopresina en MDCK.