



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**Expresión Heteróloga de Receptores Purinérgicos de  
*Xenopus laevis* en Células HEK293**

**TESIS QUE  
P R E S E N T A:**

**Biol. Itzachel Arias Buerba**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS (Neurobiología)**

**TUTOR :**

**Dr. Rogelio Arellano Ostoa**

**COMITÉ TUTORAL :**

**Dr. Ataúlfo Martínez Torres**

**Dr. Michael C. Jeziorski**



**2011**



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 Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por Itzachel del Carmen Arias Buerba, cuyo título es: “Expresión Heteróloga de Receptores Purinérgicos de *Xenopus laevis* en Células HEK293”, 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.

**Presidente:**

Dra. Carmen Clapp Jiménez.

**Secretario (Tutor):**

Dr. Rogelio Arellano Ostoa.

**Vocal:**

Dra. María del Refugio García Villegas.

**Suplente:**

Dr. Michael Jeziorski.

**Suplente:**

Dra. Isabel Méndez Hernández.

Aprobado por el Comité Académico.

---

Dra. María Teresa Morales Guzmán.

Coordinadora del Programa Maestría en Ciencias (Neurobiología)

### **...Agradecimientos...**

Al Dr. Rogelio Arellano Ostoia, por permitirme ser miembro de su laboratorio, compartir conmigo sus conocimientos y apoyarme durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Francisco Vázquez Cuevas por su invaluable asesoría, su colaboración y su disponibilidad durante el desarrollo de mis experimentos y la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Edith Garay Rojas por los consejos, la orientación y por compartir pacientemente su tiempo y conocimientos conmigo.

Al Dr. Michael Jeziorski y el Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por sus pertinentes observaciones.

A la Dra. Refugio García Villegas, la Dra. Isabel Méndez Hernández y la Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora, por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones, que mejoraron la calidad del mismo.

A la Ing. Nydia Hernández Ríos por su valiosa ayuda en la captura de imágenes de microscopía confocal.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico por la importante asistencia con los trámites académicos y administrativos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, becario 234190) porque sin su apoyo llevar al cabo este proyecto hubiera sido más complicado.

A todos los miembros de mi laboratorio por darle más sabor a estos años de convivencia.

*Para mis padres, quienes despertaron en mí el respeto y la admiración que siento por la vida.*



## ÍNDICE.

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT .....	VIII
I. INTRODUCCIÓN .....	1
Receptores purinérgicos P1 .....	1
Receptores Purinérgicos P2.....	3
Heteromerización de receptores acoplados a proteínas G.....	6
El sistema purinérgico en el modelo del folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i> .....	10
II. ANTECEDENTES.....	14
III. JUSTIFICACIÓN.....	17
IV. HIPÓTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	18
VI. MÉTODOS.....	19
Construcción del receptor P2Y8-GFP.....	19
Clonación del ADNc del receptor P2X8 en el vector pEGFP-N1 .....	21
Establecimiento de colonias monoclonales estables.....	23
Montaje de células para microscopía confocal de fluorescencia.....	23
Análisis del transcrito por RT-PCR.....	24
Análisis de la proteína por Western blot.....	25
Ensayos funcionales.....	25
VII. RESULTADOS.....	27
Obtención del ADNc del receptor P2Y8.....	27
Transfección de las construcciones.....	29
Análisis de la expresión de las construcciones.....	33
Clonas con expresión estable.....	33
VIII. DISCUSIÓN.....	39
IX. CONCLUSIONES .....	44
X. LISTA DE FIGURAS .....	45
XI. REFERENCIAS .....	46

## RESUMEN

La oligomerización de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), ha ganado interés debido a que interacciones proteína-proteína de este tipo modifican las características funcionales y farmacológicas exhibidas cuando los receptores actúan de forma monomérica.

En estudios recientes, se observó que los receptores purinérgicos en el folículo de *Xenopus* presentaban interacciones funcionales que podrían ser explicadas a través de un fenómeno de heteromerización de receptores. Estudios electrofisiológicos y farmacológicos en este modelo, indicaron que los receptores purinérgicos involucrados podrían ser del subtipo P2Y8 y A2. Interacciones semejantes a la propuesta para estos receptores de *Xenopus* han sido propuestas y demostradas por Nakata y colaboradores (2001, 2010) entre el receptor de adenosina subtipo A1 y los de ATP subtipo P2Y1 o P2Y2 a través de estudios de co-localización *in-situ* y de ensayos de transferencia de bioluminiscencia en modelos de expresión heteróloga.

En la presente tesis se propone que la interacción heteróloga de los receptores A2B y P2Y8 de *Xenopus*, podría explicar las respuestas nativas  $I_{k,AMPc}$  y  $F_{Cl}$  observadas en el folículo ovárico. El objetivo fue generar y validar herramientas moleculares que permitieran demostrar lo anterior. Para esta finalidad, fueron construidas secuencias que codifican para el receptor P2Y8, utilizando oligonucleótidos específicos conteniendo sitios para enzimas de restricción. Posteriormente, estas secuencias fueron subclonadas en el vector de expresión eucariótica pEGFP-N1, a fin de expresar los receptores fusionados, por la parte carboxilo terminal, con la secuencia de la proteína verde fluorescente (EGFP). Finalmente, células HEK293 fueron transfectadas con dichos plásmidos y el patrón de expresión de las construcciones fue analizado utilizando RT-PCR, western blot y microscopía de fluorescencia así como su funcionalidad mediante registros de  $Ca^{2+}$  intracelular. Los resultados indican que utilizando transfecciones transitorias es posible detectar el RNAm de los receptores P2Y8-GFP, así como su proteína, tanto por inmunodetección como por microscopía confocal.

Demostramos que, expresados de forma transitoria en células de pasaje bajo, dichos receptores inducen la liberación de calcio intracelular en respuesta al agonista y que, ante exposiciones prolongadas, posiblemente experimenten internalización.

## **ABSTRACT**

The oligomerization of G protein coupled receptors (GPCR) has gained relevance since it was observed that these protein-protein interactions modify the functional and pharmacological characteristics of GPCR monomers.

Recently, pharmacological assays in the *Xenopus* follicle showed interactions that could be explain by heteromerization of purinergic receptors. Electrophysiological and pharmacological evidences from this model showed that the purinergic receptors involved could be of the P2Y8 and adenosine A2 types. Nakata and coworkers (2001, 2010), through the use of *in situ* colocalization and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays in heterologous expression models, proposed and demonstrated similar interactions between the A1 adenosine and the P2Y1 or P2Y2 subtype of ATP receptors.

The present thesis proposes that the heterologous co-expression of the *Xenopus* purinergic receptors A2 (possibly A2B) and P2Y8 could explain the native responses observed in the ovarian follicle by the formation of heteromeric complexes between these receptors. In order to substantiate the proposed hypothesis, sequences codifying *Xenopus* P2Y8 receptor were synthesized using primers designed with restriction sites for Sal I, Age I and Eco RI. In this way, it was possible to subclone the constructs in the pEGFP-N1 eukaryotic expression vector in order to express the receptors with the green fluorescence protein (EGFP) attached to the carboxyl terminus. The resulting plasmids were transfected in HEK293 cells and their expression patterns and functionality were analyzed.

It was demonstrated that, when transiently expressed in low passage cells, these receptors induce the liberation of intracellular calcium when stimulated by the agonist and that, after long-term exposure, they may possibly undergo internalization.

## I. INTRODUCCIÓN

La gran gama de funciones fisiológicas de los nucleótidos de adenina en la comunicación celular se comenzó a estudiar desde principios del siglo pasado, cuando Drury y Sent-Györgyi mostraron los efectos del adenosín 5'-trifosfato (ATP) y la adenosina extracelulares sobre el corazón y los vasos coronarios; sin embargo, no fue sino hasta la década de los 70's cuando se acuñó el término *purinérgico*, para referirse a este tipo de neurotransmisión conocida originalmente como no-adrenérgica no-colinérgica (Burnstock 2006; Ralevic & Burnstock 1998).

Existe evidencia que demuestra la liberación del ATP mediada por vesículas excitóticas en nervios periféricos, osteoblastos, células endoteliales y uroteliales. También se han propuesto otros tipos de mecanismos a través de los cuales el ATP puede ser liberado de una gran variedad de tipos celulares entre los que se incluyen: moléculas transportadoras, canales formados por conexinas y panexinas, canales aniónicos dependientes de voltaje e incluso lisosomas cuya liberación es dependiente de glutamato (Burnstock 2008; Zhang *et. al.*, 2007).

Con la clonación de los receptores involucrados en la señalización mediada por nucleótidos de adenina durante la década de los 90's, fueron confirmadas las bases estructurales para clasificar a los receptores purinérgicos en dos familias: los sensibles a adenosina o P1 y los sensibles a ATP, llamados P2. Los receptores P1 conocidos son receptores de 7 pasos transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR). Mientras que los receptores P2 fueron clasificados en dos subfamilias, de acuerdo con su estructura molecular y su mecanismo de acción. Los receptores P2X son canales iónicos y los receptores P2Y, al igual que los P1, son receptores acoplados a proteínas G (Burnstock 2006; Ralevic & Burnstock 1998).

### ***Receptores purinérgicos P1***

La adenosina es un regulador fundamental de múltiples procesos fisiológicos de gran importancia en organismos, tanto animales como plantas, que abarca prácticamente toda la escala filogenética desde organismos unicelulares, invertebrados como *Drosophila*, hasta mamíferos, incluido el ser humano. Como molécula de señalización

extracelular, se forma por degradación del ATP, que al ser producido intracelularmente, es liberado al espacio extracelular por diversos estímulos, donde es degradado hacia adenosina por acción de las ectonucleotidasas; sin embargo, también puede ser liberada desde el interior celular por acción de transportadores (Haskó *et al.*, 2009; Manjunath & Sakhare 2010)

Por otro lado, se sabe que la adenosina tiene funciones antioxidantes y que juega un papel importante en la agregación de plaquetas, la lipólisis, la inducción del sueño y la neuroprotección. Asimismo, alteraciones en sus funciones, han sido asociadas con patologías como la taquicardia supraventricular paroxismal y el síndrome de Wolf Parkinson White (Manjunath & Sakhare 2010).

Actualmente, se reconocen cuatro diferentes subtipos de receptores P1 mediante los cuales la adenosina ejerce sus acciones: A1, A2A, A2B y A3. Comparando su estructura molecular con la de otros GPCRs, el amino terminal de estos receptores es relativamente corto (7–13 a.a.), así como también su carboxilo terminal (32–120 a.a.). Asimismo, se sabe que estos receptores ejercen su acción principalmente a través de adenilato ciclasa (AC); A1 y A3 son receptores que inhiben su acción a través de la activación de la subunidad  $G\alpha_{i/o}$ , mientras que A2A y A2B, propician su activación actuando a través de proteínas  $G\alpha_s$  (Umapathy *et al.*, 2009; Reshkin *et al.*, 2000).

En general, los receptores A1, A2A y A3 se han descrito como receptores de alta afinidad, porque se activan con concentraciones submicromolares de adenosina, mientras que los A2B requieren niveles micromolares, que solamente se alcanzan en tejidos que han sufrido estímulos muy estresantes como la isquemia y la inflamación. Por ello, han sido descritos como sensores de daño tisular durante la respuesta inmunológica, teniendo un papel no redundante en la atenuación de la inflamación *in vivo*, e incluso con efectos sobre la función vascular, favoreciendo la producción de VEGF y la vasodilatación, mediante la relajación del músculo liso de los vasos sanguíneos (Haskó *et al.*, 2009; Sitkovsky & Ohta 2005; Dubey 2001).

En ensayos realizados con ratones transgénicos, se observó que la expresión del receptor A2B estaba ampliamente distribuida e involucra tejidos y órganos tan variados como los vasos sanguíneos, vejiga, colon, pulmones, riñón y músculo liso. Igualmente, estudios en líneas celulares revelaron un fuerte nivel de su expresión en

macrófagos, linfocitos, células dendríticas y neutrófilos (Yang *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2007).

Aunque se conoce que el receptor A2B regula diversas vías de señalización, las mejor estudiadas son aquéllas que involucran el incremento del AMPc por acción de la proteína  $G\alpha_s$  sobre la adenilato ciclasa (AC) y la que favorece la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la liberación del  $Ca^{2+}$  intracelular, por efecto de la proteína  $G\alpha_q$  sobre la fosfolipasa  $C_\beta$  (PLC $_\beta$ ) (Reshkin *et al.*, 2000; Sitkovsky & Ohta 2005).

Con respecto a su farmacología, hasta hace pocos años no existían agonistas selectivos para distinguirlos de los otros miembros de la familia de receptores P1. No obstante, se sabía que el agonista 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) permitía distinguir las acciones a través del A2B lo de otros receptores de adenosina, cuando era co-expresado con ellos (A1, A2A ó A3), con base en la eficiencia de respuestas obtenidas por efecto de antagonistas selectivos como el RS-1754 y el CVT-6883 (Haskó *et al.*, 2009; Manjunath & Sakhare 2010).

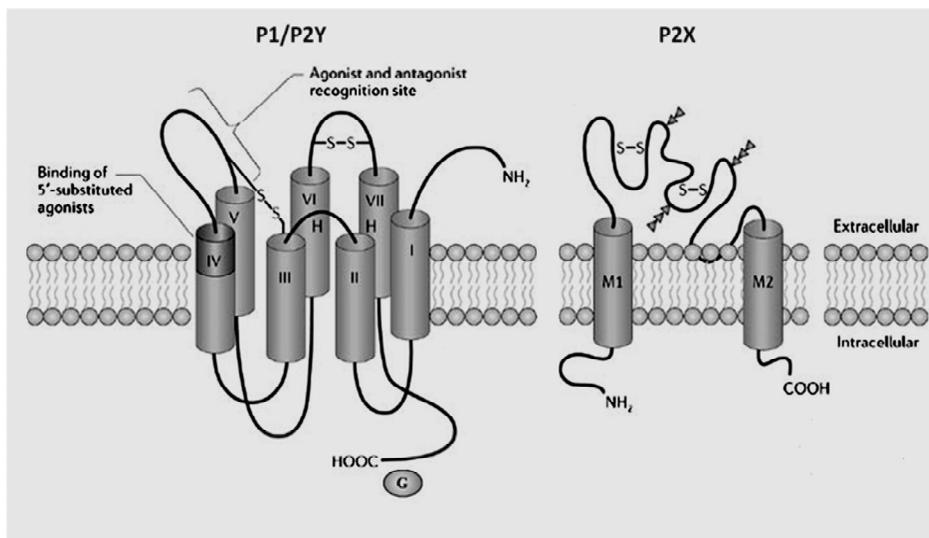
### ***Receptores Purinérgicos P2***

Como anteriormente se mencionó, el ATP liberado en el espacio extracelular, ejerce sus efectos mediante receptores P2, los cuales se han agrupado en 2 subfamilias: los P2X y los P2Y.

La subfamilia P2X está conformada por 7 diferentes subunidades (P2X1–7), que han sido clonadas y caracterizadas, y conforman receptores-canal triméricos. Topológicamente, tienen sus extremos carboxilo y amino citoplasmáticos, en los cuales presentan numerosos sitios blanco para la acción de cinasas; además de 2 regiones transmembranales (TM1 y TM2) de las cuales se ha descrito que participan en la formación del poro. Conjuntamente, presentan una larga asa extracelular, con 10 residuos conservados de cisteína que forman varios puentes disulfuro, y una región hidrofóbica cercana al poro denominada H5, donde posiblemente esté ubicado el sitio de unión al ATP y se lleven al cabo diversas modulaciones del canal por cationes (Burnstock 2007).

En cuanto a los receptores P2Y, ocho subtipos de ellos han sido descritos en mamíferos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14. A diferencia

de otros receptores purinérgicos, sus genes no contienen intrones en las secuencias codificantes, con excepción del receptor P2Y11, y se sabe que varios residuos con carga en los dominios transmembranales TM3, TM6 y TM7 son cruciales para su activación. Los receptores P2Y1, 2, 4, 6 y 11 se acoplan de forma preferente a la proteína  $G_{\alpha q}$ , mediante la cual estimulan a la fosfolipasa C. No obstante, se ha observado que el P2Y11 también es capaz de estimular la adenilato ciclasa por asociación con una proteína  $G_{\alpha s}$ . En cambio, los subtipos 12, 13 y 14, provocan la inhibición de la adenilato ciclasa, debido a la acción de la proteína  $G_{\alpha i}$ , a la cual se acoplan de forma preferente (Abbracchio *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2007).



**Figura A. Estructura molecular de los receptores purinérgicos** (Modificado de Douglas & Burnstock, 2006)

Por otro lado, se sabe que cada subtipo de receptor P2Y responde diferente a los nucleótidos de purina, siendo ATP el agonista más potente para P2Y11 en mamíferos, mientras que P2Y4 es activado igualmente por ATP o UTP, y ADP es el más efectivo para P2Y1, P2Y12 y P2Y13. El P2Y6 es preferencialmente activado por UTP, mientras que el P2Y14 por UDP-glucosa (Von Kugelgen 2006, Vásquez-Cuevas *et al.*, 2010).

También es bien conocido que este tipo de receptores están involucrados en procesos como la agregación de plaquetas, vasodilatación, neuromodulación, flujo iónico, diferenciación y comunicación sináptica, siendo notable el hecho de que las

respuestas mediadas por los receptores P2Y tienen lugar tanto en células del sistema nervioso como en otros tipos no neuronales ni musculares, donde también están relacionadas con señalización cuyos efectos son a corto plazo, en fenómenos como el metabolismo del glicógeno, o a largo plazo, en procesos como proliferación y muerte celular, fertilización, diferenciación durante el desarrollo y regeneración de tejidos. De hecho, se sabe que los receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, y P2Y6 actúan incrementando el inositol trifosfato (IP3) y el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, así como también que la acción simultánea de varios de estos receptores está asociada con la activación de la vía de las MAP cinasas. Recientes descubrimientos, parecen sugerir que podrían estar involucrados en la modulación de canales iónicos dependientes de voltaje (Sitkovsky y Ohta 2005; Montiel *et al.*, 2006; Burnstock, 2011).

Otros receptores P2Y diferentes a los anteriormente mencionados, se consideran ortólogos de los descritos en mamíferos. Tal es el caso del P2Y3 de pollo, que podría ser el ortólogo P2Y6 de mamíferos, mientras que el P2Y8 de la rana *Xenopus laevis* y el tP2Y de pavo, parecen ser los respectivos ortólogos del P2Y4 en mamíferos. Los P2Y5 y P2Y10 son considerados receptores huérfanos, en tanto que el P2Y9 ha sido reportado como un posible receptor para ácido lisofosfatídico no emparentado con la familia *Edg* (Burnstock 2007; Abbracchio *et al.*, 2006).

### ***El receptor P2Y4***

El subtipo P2Y4 ha sido clonado en humano, rata y ratón. En el ser humano, su agonista más potente es el UTP, mientras que el ATP actúa como un antagonista competitivo. En cambio, en la rata y el ratón, tanto el UTP como el ATP son agonistas, activándolo con la misma potencia, tal como sucede con el P2Y2. Por lo anterior, en roedores, ambos receptores purinérgicos son farmacológicamente indistinguibles. (Communi *et al.*, 1995; Nicholas *et al.*, 1996; Bogdanov *et al.*, 1998b; Webb *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000; Lazarowski *et al.*, 2001)

Por otro lado, han sido clonados sus ortólogos de pavo (*Meleagris gallopavo*) y de la rana *Xenopus laevis*, denominados tP2Y y P2Y8 respectivamente, los cuales responden de forma equipotencial a ATP, UTP, GTP e ITP. (Bogdanov *et al.*, 1997; Boyer *et al.*, 2000; Abbracchio *et al.*, 2006).

La activación del receptor P2Y4 genera aumento de IP3 intracelular, no obstante esta

respuesta es parcialmente inhibida por la toxina *pertusis* lo que sugiere que el receptor P2Y4 se acopla principalmente a proteínas  $G\alpha_{q/11}$  y adicionalmente a proteínas  $G\alpha_{i/o}$ . (Communi *et al.*, 1996).

El receptor P2Y8, como ya se mencionó, es el ortólogo de P2Y4 en la rana *Xenopus laevis*. Originalmente llamado XIP2Y, fue clonado de la cresta neural de embriones de este organismo, donde se propuso que se expresa durante la neurogénesis, aunque recientemente su expresión ha sido analizada en la rana adulta, y su transcrito se ha detectado en ADNcs provenientes de cerebro, de corazón y de células foliculares, de modo tal que es muy posible que sus acciones fisiológicas sean más amplias y no se limiten al desarrollo embrionario. (Bogdanov *et al.*, 1997; Romero, 2006).

Estructuralmente, es una proteína de 532 aminoácidos, de los cuales 26 están conservados en toda la familia P2Y. En su cola carboxilo terminal de 216 aa, se ha descrito el sitio palmitoilación presente en la gran mayoría de los GPCRs, así como sitios potenciales de fosforilación para cinasas dependientes de calmodulina (CaMKs), la cinasa glucógeno sintasa 3 (GSK3) y las proteínas cinasas A (PKA) y C (PKC). Además, para esta última, también se describió un sitio de fosforilación en la tercera asa intracelular. En cambio, su dominio amino terminal contiene dos sitios potenciales glicosilación en asparaginas y una cisteína conservada, presente en todos los receptores de la familia P2Y. Igualmente, en cada una de sus asas extracelulares están presentes las cisteínas con las cuales se conforman dos puentes disulfuro, también propios de estos receptores. (Bogdanov *et al.*, 1997).

Por otro lado, aunque se cree que podría estar acoplado a una proteína  $G\alpha_q$  de forma endógena, esto no se ha confirmado, y se sabe que, expresado de manera heteróloga en ovocitos, responde de forma equipotencial a ATP, UTP, CTP y GTP (Bogdanov *et al.*, 1997).

### ***Heteromerización de receptores acoplados a proteínas G***

Las interacciones proteína-proteína son esenciales para la señalización celular. La gran mayoría de estas vías son desencadenadas por la activación de receptores que,

frecuentemente, se encuentran asociados con la membrana plasmática.

La interacción entre receptores con actividad de cinasa de tirosina del mismo tipo es un fenómeno necesario y aceptado desde hace muchas décadas; sin embargo, un concepto trascendental y novedoso en la biología celular es el hecho de que este tipo de interacciones también ocurren entre los receptores acoplados a proteínas G, que hasta poco más de una década eran considerados como entidades exclusivamente monoméricas. Sin embargo, actualmente existe evidencia de que también pueden interactuar directamente con componentes de sus respectivas cascadas de transducción, como sucede con el receptor de angiotensina II, con el cual el grupo de Ali y colaboradores (1997) observaron una asociación directa entre el motivo YIPP del carboxilo terminal de dicho receptor y la cinasa Jak2 (Bouvier 2001).

Las primeras evidencias de que este tipo de interacciones moleculares existen en las células datan de los años 80's cuando, mediante ensayos de unión de radioligando y *Western blot*, se observaron las primeras interacciones receptor-receptor en preparaciones de membranas de cerebros de rata y médula espinal. En esta clase de interacciones, la estimulación de un receptor cambiaba la afinidad del otro por ligandos endógenos o exógenos. Estos cambios no dependían de componentes de la señalización intracelular y sugería algún tipo de interacción cooperativa entre receptores adyacentes. A principios de la década de los 80's, tras el descubrimiento de asociaciones funcionales del mismo tipo para neurotransmisores, fue propuesto que el mismo mecanismo molecular podría también favorecer la formación de interacciones entre GPCRs de diferente tipo (Franco *et al.*, 2007).

Actualmente se conocen numerosos GPCRs que presentan estas interacciones en la membrana plasmática. Este fenómeno, conocido como oligomerización, es llamado *homomerización* de receptores, cuando se trata de una interacción entre 2 o más receptores iguales, o *heteromerización* cuando los receptores son diferentes. Se piensa también que éste es uno de los fenómenos responsables de la especificidad de las señales, provocando que un mismo receptor tenga funciones –y efectos– diferentes en distintos tipos celulares. De hecho, han sido descritos más de 30 tipos de receptores GPCR que pueden formar homómeros mientras que, casos de heteromerizaciones, se conocen más de 20 (Von Kugelgen 2006; Bouvier 2001).

Experimentalmente, han sido detectadas directamente utilizando varias estrategias como: i) Ensayos de unión de radioligandos, ii) coinmunoprecipitación, iii) Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) mediante ligandos acoplados a fluoróforos, iv) Transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) por medio de receptores quiméricos acoplados a proteínas fluorescentes y luminiscentes, v) Anticuerpos selectivos para homómeros o heterómeros, y vi) Ligandos específicos que solamente pueden acoplarse a sitios de unión “alterados” en los complejos formados.

Considerando que numerosas patologías están asociadas con mutaciones y polimorfismos en este tipo de receptores, y que son blancos de aproximadamente el 25% de los fármacos más efectivos que existen en la actualidad, es de vital importancia conocer el efecto de interacciones que modifican las características funcionales y farmacológicas que exhiben cuando actúan de forma individual. Por ejemplo, se han reportado casos de dimerizaciones en los cuales durante las interacciones se forman sitios alternativos de unión del ligando, o la respuesta ante éste se incrementa o decrecienta. Igualmente, se han encontrado casos en los que el acoplamiento a las proteínas G se inhibe o cambia por completo, activando vías de señalización diferentes. Un ejemplo de éste último caso, es el descrito por Rashid y colaboradores, quienes observaron que la heteromerización entre receptores dopaminérgicos tipo D1-D2 da lugar a un cambio en el acoplamiento de la proteína  $G_{\alpha_s/olf}$  en el receptor D1, o una  $G_{\alpha_i}$  en el receptor D2, a una  $G_{\alpha_q/11}$  y la activación de la vía de señalización típicamente mediada por ella (Franco *et al.*, 2008; Rozenfeld & Devi 2010; Rashid *et al.*, 2007).

La forma en que estas asociaciones se llevan al cabo, aún no está totalmente esclarecida; sin embargo, ensayos de mutagénesis dirigida involucran a los segmentos carboxilo terminales y los transmembranales TM7 para el caso de la heteromerización de los receptores para GABA<sub>B</sub>, (George *et al.* 2002) y en los últimos años han surgido evidencia que implica la participación de los segmentos TM4 y TM5, en heteromerizaciones conformadas por los receptores D2, 5-HT4 y mGluR2 entre otros, para dopamina serotonina y glutamato, respectivamente (Fiziola 2010).

Entre los receptores purinérgicos P1 y P2Y también se han observado este tipo de interacciones, ya sean recíprocas o unidireccionales, y con ambos o sólo uno de los

receptores modulando la respuesta del otro. Estos fenómenos han sido descritos entre receptores de adenosina (A1/A2A), con receptores de dopamina (A1/D<sub>2</sub>) y con otros receptores purinérgicos (Ferré *et al.* 2007). A éste último caso pertenece el fenómeno reportado por Nakata y colaboradores, quienes describieron la heteromerización de los receptores para adenosina A1 y para ATP P2Y1 (Figura A) (Yoshioka *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 2005) y P2Y2 (Susuki *et al.*, 2006; Namba 2010)

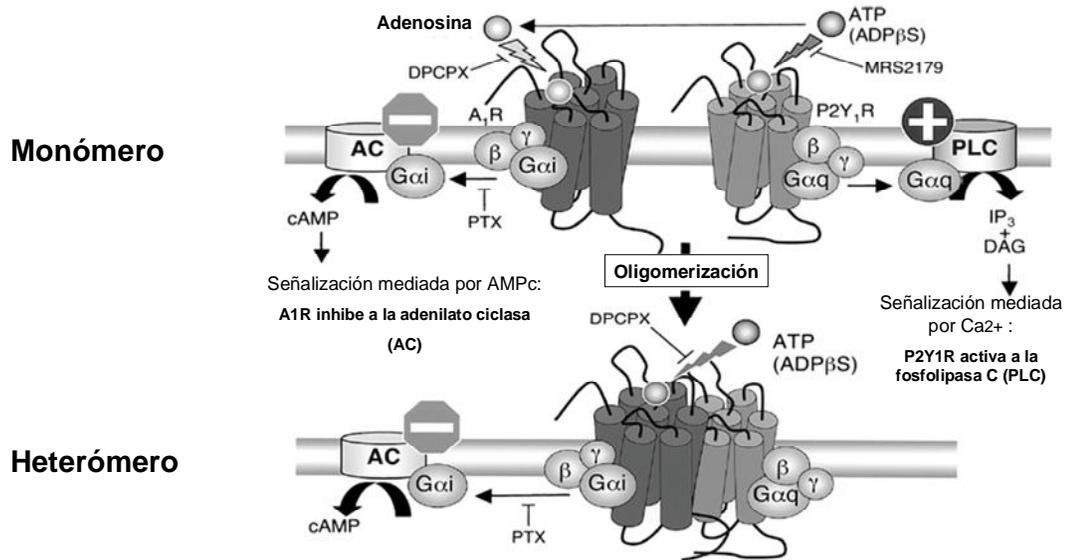
Dicho grupo detectó la colocalización de dichos receptores en varias regiones de la corteza cerebral de rata, así como en el hipocampo y el cerebelo. Posteriormente demostraron, por co-inmunoprecipitación, la existencia de complejos heteroméricos usando anticuerpos específicos contra ambos receptores, en extractos solubles de membranas celulares provenientes de dichos tejidos. Adicionalmente, mediante ensayos de expresión heteróloga y *BRET* en células HEK293, observaron que las propiedades de unión del receptor A1, se modificaron significativamente después de la cotransfección con el ADNc del receptor P2Y1 (Nakata *et al.* 2005).

Por medio de ensayos farmacológicos, notaron que, cuando transfectaban únicamente el receptor A1 y lo estimulaban, ya fuera con adenosina (su ligando natural) o con un agonista (CPA), se inhibía la actividad de la adenilato ciclasa y la producción de AMPc. En cambio, al utilizar un antagonista (DPCPX), estas vías, se estimulaban, indicando que el receptor A1 estaba acoplado a una proteína G $\alpha_{i/o}$ . (Nakata *et al.* 2005).

Por otro lado, al transfectar solamente el P2Y1 y estimularlo ya fuera con ATP o con el agonista ADP $\beta$ S se activaban vías de señalización mediadas por IP<sub>3</sub> y la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular que, a su vez, se inhibían al estimularlo con el antagonista MRS179. Con lo anterior se demuestra que la proteína G a la cual se acopla el P2Y1 de forma individual es una G $\alpha_{q/11}$  (Nakata *et al.* 2005).

No obstante, cuando ambos receptores eran co-tranfectados, independientemente de que se fueran estimulados con adenosina, ATP o los agonistas de cualquiera de los dos receptores, el receptor se acoplaba a la proteína G $\alpha_i$  provocando inhibición de la adenilato ciclasa (Nakata *et al.* 2005) en forma semejante a lo sucedido con la activación del receptor A1.

En células cotransfectadas el agonista específico para P2Y1, ADP $\beta$ S, fue capaz de activar la proteína G $\alpha_i$ , produciendo de esta manera la respuesta típica del receptor A1, inhibición de la adenilato ciclasa y disminución en la síntesis de AMPc. Este cambio dramático en la vía de señalización del receptor P2Y1 representa un efecto fisiológico notable (Nakata *et al.* 2005).



**Figura B.** Modelo de heteromerización entre los receptores purinérgicos A1 y P2Y1, propuesto por Nakata y colaboradores (Modificado de Nakata *et al.*, 2001).

### ***El sistema purinérgico en el modelo del folículo ovárico de *Xenopus laevis*.***

El folículo ovárico de *Xenopus laevis* consiste en un ovocito que mide de 1.2 a 1.4 mm de diámetro, rodeado de varias capas de células somáticas, entre las que se encuentran una monocapa de células foliculares acopladas entre sí y con el ovocito mediante uniones comunicantes. La membrana basal de estas células está conformada por una capa acelular de tejido conectivo ubicada entre ellas y las capas celulares más externas (teca y células del epitelio interno ovárico). Se sabe que tanto las células foliculares como las de la teca, regulan la maduración y el desarrollo del ovocito, respondiendo a estímulos neuronales, hormonales y humorales (Fujita *et al.*, 2007)

Debido a la transmisión eléctrica entre las células foliculares y el ovocito, es posible medir la actividad eléctrica de este complejo insertando electrodos de registro en el ovocito, arreglo experimental que en nuestro laboratorio ha sido utilizado para estudiar la comunicación entre estos tipos celulares. En mamíferos, esta interacción es fundamental para el desarrollo del gameto, ya que se sabe que tanto el acoplamiento eléctrico como la comunicación química, a través de transmisores parácrinos y autócrinos, mantienen un diálogo entre estos dos tipos celulares propiciando su mutuo desarrollo, diferenciación y crecimiento (Eppig 2001; Matzuk *et al.*, 2002). Ejemplo de esta comunicación es la generación de las corrientes de  $K^+$ , inducidas por estimulación de la hormona folículo-estimulante (FSH) o de la adenosina (Ado), corrientes que pueden ser replicadas mediante el aumento farmacológico del AMPc intracelular.

En esencia, el mecanismo consiste en la estimulación de receptores específicos para cada transmisor, que se encuentran expresados en la membrana de las células foliculares; al estar éstos acoplados a la síntesis de AMPc a través de una proteína  $G_{\alpha_s}$ , se produce el aumento de AMPc, lo que en la membrana de las células foliculares tiene al menos dos efectos importantes. Por un lado, provoca la apertura de canales de  $K^+$  que promueven una hiperpolarización del folículo y, por otro, el nivel elevado del nucleótido cíclico parece mantener el arresto meiótico del ovocito. Esta respuesta es también estimulada por agonistas adrenérgicos, catecolaminérgicos y varios péptidos bioactivos, generando corrientes de  $K^+$  que no se observan en ovocitos desfoliculados. La respuesta de  $K^+$  dependiente de AMPc puede ser estimulada además por el ATP (Saldaña *et al.*, 2005; Arellano *et al.*, 1996; 2009). Sin embargo, éste efecto se modifica, dependiendo de la presencia o ausencia de todas o algunas de las capas celulares descritas, como se detallará más adelante.

Los sistemas de señalización endógenos que utilizan sustancias purinérgicas como transmisores en el ovocito, fueron reportados inicialmente por Lotan y colaboradores (1982), quienes observaron la generación de corrientes evocadas por adenosina y ATP, caracterizando dos corrientes a las que designaron H (hiperpolarizante) y D (despolarizante). Posteriormente se demostró que estas respuestas, muy semejantes a las descritas originalmente para acetilcolina (ACh) y dopamina por el grupo de Miledi (1977), tenían en realidad un origen mixto, ya que en su generación estaban

involucrados tanto la monocapa de células foliculares, como el ovocito. Ejemplo de lo anterior son las corrientes oscilatorias de  $\text{Cl}^-$  activadas por ACh que se mantienen en ovocitos desfoliados, mientras que las acarreadas por  $\text{K}^+$  y activadas por catecolaminas, requieren de la integridad del folículo. Al respecto, experimentos de desfoliación demostraron que esta disección no solo elimina la respuesta de  $\text{K}^+$  activada por catecolaminas, sino también las generadas por diversas hormonas, y agonistas adrenérgicos y catecolaminérgicos, junto con las inducidas por transmisores purinérgicos como la adenosina y el ATP, lo que demuestra que son respuestas originadas en las células foliculares y transmitidas al ovocito a través de comunicación eléctrica mediada por las uniones comunicantes. Ahora bien, dada la participación del AMP cíclico (AMPc) en su generación, a esta respuesta actualmente se le conoce como corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de AMPc ( $I_{\text{K, AMPc}}$ ) (Woodward & Miledi, 1989; Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996).

Con respecto a las respuestas de  $\text{Cl}^-$  generadas por receptores muscarínicos, se demostró que involucran, tanto canales de  $\text{Cl}^-$  localizados en la membrana del ovocito (los cuales provocaban una corriente oscilatoria) como canales ubicados en las células foliculares. Este último componente provocaba respuestas compuestas por varias fases, de las cuales al menos dos son eliminadas por desfoliación, y que cada una de ellas depende de la apertura de canales de  $\text{Cl}^-$  con características intrínsecas diferentes. Actualmente a estas corrientes se les conoce como  $F_{\text{Cl}}$  y  $S_{\text{Cl}}$  (Arellano & Miledi, 1993). A diferencia de las respuestas colinérgicas, las respuestas foliculares provocadas por el ATP son todas originadas en las células foliculares y corresponden a las corrientes  $F_{\text{Cl}}$  y  $S_{\text{Cl}}$ . Éstas, al igual que la corriente de  $\text{K}^+$ , también cambian en amplitud dependiendo del tipo de preparación que se utiliza para su registro. (Arellano *et al.*, 1996; 1998),

Es importante resaltar en este punto, que el ovocito desnudo no presenta ninguna respuesta eléctrica a la adenosina o al ATP, lo que sugiere que en la membrana del ovocito no son expresados receptores purinérgicos. Sin embargo, ha sido demostrado que el ovocito tiene la capacidad de liberar ATP desde su medio intracelular, y que este transmisor difunde hasta la membrana de las células foliculares y estimula de forma parácrina a las células foliculares (Saldaña *et al.*, 2005). Esta liberación de ATP tiene dos componentes, uno basal, así que esta liberación mantiene un nivel tónico de

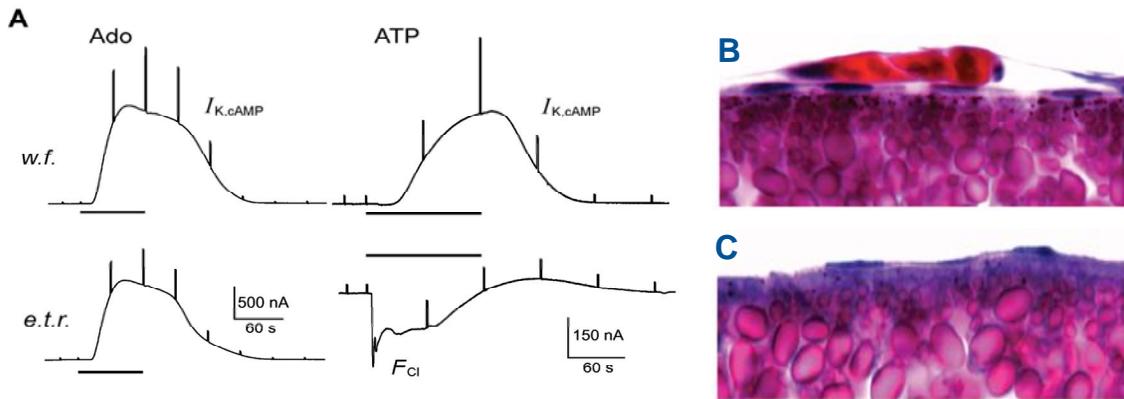
estimulación, y otro que puede ser estimulado a través de perturbaciones mecánicas (Saldaña *et al.*, 2008). Estos experimentos muestran que el complejo formado por el ovocito y sus células foliculares, mantienen un sistema endógeno de comunicación purinérgica (i.e., liberación del transmisor, así como la expresión de receptores específicos, de la maquinaria de respuesta y de los respectivos efectores). En cierto sentido, la comunicación purinérgica folicular tiene direccionalidad, originándose en el ovocito por la liberación del transmisor hacia las células foliculares que responden al ser estimulados los receptores correspondientes, generándose entonces corrientes iónicas que son transmitidas al ovocito a través de la comunicación eléctrica, así como un posible aumento en los niveles de segundos mensajeros involucrados a través del acoplamiento metabólico.

Finalmente, dado que se ha observado que el ATP es capaz de activar ambas corrientes foliculares de modo similar a lo reportado para ACh, se propuso que dicho fenómeno es mediado por un mismo tipo de mecanismo intracelular. Para la activación de la  $F_{Cl}$ , recientemente fue demostrado que este mecanismo corresponde con la activación de la fosfolipasa C, producción de  $IP_3$ , liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular y activación de canales de  $Cl^-$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , expresados en la membrana de las células foliculares (Robles-Martínez 2011; Arellano *et al.*, 2011).

## II. ANTECEDENTES

En estudios previos relacionados con las corrientes activadas por purinas en el folículo de *Xenopus*, se observó que la regulación de canales iónicos por la activación de receptores purinérgicos es diferente en el folículo completo ("*whole follicle*"; *w.f.*) que en folículos a los que se les ha removido el epitelio y la teca ("*epithelium and theca removed*"; *e.t.r.*), pero que conservan las células foliculares. Esta disección mantiene la membrana basal de las células foliculares y permite estudiar de forma aislada la comunicación entre el ovocito y las células que lo rodean, interacción de suma importancia para el desarrollo del folículo en general.

De este modo, monitoreando eléctricamente preparaciones *w.f.* y folículos *e.t.r.*, se demostró que la presencia de la teca y el epitelio permite la activación de una corriente saliente de  $K^+$ , dependiente de AMP cíclico (cAMP) e inducida por ATP, de la misma naturaleza que la respuesta  $I_{K,cAMP}$  la cual, como previamente se mencionó, es activada por una gran variedad de agonistas. En estos estudios se determinó que la remoción del epitelio y la teca eliminaba la capacidad del ATP de inducir dicha corriente, es decir, el epitelio y/o la teca son requeridos para que el ATP, actuando a través de un receptor, estimule a la adenilato ciclasa y active la corriente  $I_{K,cAMP}$ . Este efecto es específico para receptores P2Y, dado que cuando la  $I_{K,cAMP}$  es activada por adenosina, no es afectada por la remoción del epitelio/teca (Figura B). (Saldaña *et al.*, 2005; Arellano *et al.*, 2009). Además, la remoción del epitelio y la teca en los folículos *e.t.r.*, no sólo provocaban la eliminación de la respuesta  $I_{K,cAMP}$  sino que potenciaba la generación de la respuesta  $F_{Cl}$  descrita anteriormente, por lo que se demostró que la respuesta a la aplicación de ATP cambiaba, de un mecanismo que promovía la síntesis de AMPc (asociada a la generación de  $I_{K,cAMP}$ ), a otro que provocaba la síntesis de  $IP_3$  (asociada a la generación de la respuesta  $F_{Cl}$ ).



**Figura C.** A. Corrientes generadas en folículos *w.f.* (arriba) o *e.t.r.* (abajo) ante la estimulación con adenosina (Ado) o ATP. Derecha: Cortes histológicos de folículos *w.f.* (B) o *e.t.r.* (C).

Por lo tanto, este cambio radical en la capacidad del receptor a ATP entre las preparaciones *w.f.* y *e.t.r.*, parece ser debida a un conjunto de cambios que ocurren de tres formas:

1. El receptor presente en el folículo completo estimula la producción de AMPc, y este acoplamiento no ocurre o se ve disminuido en los folículos sin epitelio y teca (*e.t.r.*)
2. El receptor sensible a ATP en los folículos *e.t.r.* se acopla de forma más eficiente a una proteína  $G\alpha_q$ , que activa, en lugar de la  $I_{K,AMPc}$ , a la corriente  $F_{Cl}$ , a través de un mecanismo que involucra la activación de la fosfolipasa C.
3. Esta preferencia alterna en los folículos *e.t.r.* por el mecanismo que activa  $F_{Cl}$  también promueve la inhibición de la  $I_{K,CAMP}$ . Debido al conjunto de estos cambios, los canales de  $K^+$  que generan la  $I_{K,CAMP}$  en los folículos *e.t.r.*, no pueden ser activados por ATP.

Estas tres modificaciones funcionales también van acompañadas de cambios en la farmacología de los receptores purinérgicos involucrados. El más importante de estos cambios es el hecho de que en el caso del folículo completo parece tratarse de la expresión de un receptor que es igualmente sensible tanto a adenosina como a ATP, y es insensible a agonistas como UTP y 2MeS-ATP (Arellano *et al.*, 2009).

Hasta el momento no existe información de secuencias genéticas que codifiquen para

receptores que modifiquen la actividad de la adenilato ciclasa con las características farmacológicas observadas en las preparaciones *w.f.* No obstante, se sabe que la heteromerización entre receptores purinérgicos puede provocar cambios semejantes en su función y su farmacología, por lo que es probable que los cambios funcionales en las respuestas purinérgicas foliculares sean provocados por la regulación de un heterómero de este tipo, cuyos componentes moleculares son el motivo de estudio de la presente tesis.

De la naturaleza de los probables receptores involucrados se conocen algunos datos importantes, esencialmente que: en estudios utilizando RT-PCR quedó demostrado que el receptor tipo P2Y8 es el de mayor expresión en folículos *w.f.* y *e.t.r.*, la farmacología (sensibilidad a ATP, UTP, 2MeS-ATP y Bz-ATP) de estos receptores concuerda, en cierto sentido, con aquella mostrada por los receptores involucrados en la generación de  $F_{Ca}$ , y que la expresión de este receptor en la membrana del ovocito propicia la activación la fosfolipasa C. Por otro lado, ha sido documentado que la farmacología del receptor a adenosina es similar a aquella demostrada para receptores tipo A2B (Cobb *et al.*, 2002).

### III. JUSTIFICACIÓN

A partir de los estudios descritos, se deriva la propuesta de que los fenómenos observados en preparaciones tipo *w.f.*, es decir, la activación de la respuesta  $I_{K,cAMP}$  por un receptor sensible a adenosina y a ATP, son debidos a que el receptor P2Y8 se heteromeriza con un receptor de adenosina (presumiblemente el A2B), estableciendo un nuevo receptor heteromérico con características farmacológicas y funcionales diferentes a las presentadas por sus componentes monoméricos. De este modo, en las preparaciones de folículo completo, el posible heterómero compuesto por los receptores P2Y8 y A2B, formarían un receptor sensible tanto a adenosina como a ATP, que generaría la síntesis de AMPc mientras que, en preparaciones de folículos *e.t.r.*, la proporción de este receptor heteromérico sería regulado a la baja, y los receptores monoméricos resultarían funcionarían de forma específica a adenosina o a ATP. Así, el receptor A2B continuaría promoviendo principalmente la síntesis de AMPc, mientras que el P2Y8 lo haría a través de la fosfolipasa C.

Si lo anterior ocurriera en el sistema nativo, es posible que la clonación de los receptores y su expresión en un sistema heterólogo proporcione un modelo que permita estudiar cómo la asociación entre los dos receptores se lleva al cabo, de forma tal que fuera posible estudiar en detalle los elementos estructurales que a nivel molecular estén involucrados. La propuesta del presente trabajo es estandarizar la metodología que permita estudiar la posible formación del heterómero entre el receptor P2Y8 y el A2B. Para ello desarrollamos parte de las herramientas utilizando métodos de biología celular y molecular, así como microscopía de fluorescencia que permitieron la experimentación utilizando el receptor P2Y8 de rana, evaluando además, su funcionalidad y eficiencia de expresión en sistemas heterólogos.

#### IV. HIPÓTESIS

La expresión heteróloga del receptor P2Y8 de *Xenopus laevis* fusionado a la proteína verde fluorescente en células HEK293 será funcional y se acoplará al mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

#### V. OBJETIVOS

##### *Objetivo general*

Expresar el receptor P2Y8 de *Xenopus laevis* en un sistema heterólogo y analizar su localización subcelular y su funcionalidad.

##### *Objetivos particulares*

- Obtener las secuencias codificantes del receptor P2Y8 completo y truncado en el extremo COOH terminal en el marco de lectura de la proteína verde fluorescente (GFP).
- Transfectar ambas construcciones en células HEK293 y evaluar su patrón de expresión
- Verificar la funcionalidad de las construcciones en el sistema heterólogo mediante registros de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .
- Analizar la localización celular del receptor transfectado mediante microscopía confocal.
- Evaluar el efecto de la delección de la secuencia correspondiente al COOH terminal sobre la distribución y funcionalidad del receptor P2Y8.

## VI. MÉTODOS

### ***Construcción del receptor P2Y8-GFP***

Con el fin de generar un receptor que pudiera ser utilizado en estudios de microscopía de fluorescencia se generó el receptor quimérico P2Y8-GFP, fusionando el ADNc completo del receptor (a partir del cual se genera una proteína 537 aa) con la secuencia de la EGFP (225 aa) en a su extremo COOH terminal (Y8.1 y Y8.2). Además se diseñó una variante del P2Y8 que carece del extremo carboxilo terminal (321 aa), en el cual la EGFP está fusionada al final del séptimo pase transmembranal de P2Y8; a esta variante la denominamos P2Y8 $\Delta$ COOH (Y8 $\Delta$ C).

Para construir estas proteínas la estrategia consistió en la amplificación por PCR del ADNc completo del receptor o el ADNc sin la región que codifica para el COOH terminal. Se utilizó como templado el ADNc de P2Y8, clonado en el vector de expresión *pXen*, y oligonucleótidos en los cuales se incluyeron sitios de restricción que permiten su inserción en el vector pEGFP-N1. Estos oligos permitieron la amplificación de dos secuencias diferentes: la primera codifica un receptor P2Y8 completo y la segunda para el receptor truncado del carboxilo terminal (P2Y8 $\Delta$ COOH).

Los productos fueron amplificados utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad (High fidelity mix, Invitrogen) y se purificaron a partir de un gel de agarosa al 1% utilizando el estuche comercial *QuiaQuick PCR Purification* (Quiagen).

Posteriormente, se clonaron los productos de PCR del ADNc completo del receptor P2Y8 en un vector de clonación directa para productos de PCR. Dado que la enzima utilizada produce extremos rasos, recurrimos al vector pCR4-TOPO (Invitrogen), que confiere resistencia a ampicilina. Los fragmentos de ADN en el vector pCR4-TOPO, generaron los plásmidos pCR4-TOPO-Y8.1, pCR4-TOPO-Y8.2 y pCR4-TOPO-Y8 $\Delta$ C, conteniendo los dos primeros la secuencia codificante del receptor completo y el último la del truncado del COOH terminal. Con los insertos clonados en este vector, se transformaron bacterias *E. coli* competentes, que fueron sembradas en medio LB-agar con ampicilina.

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del ADNc del receptor P2Y8.**

Oligonucleótido	Sitios de complementaridad (pb)	Secuencia	Temperatura de alineación	Tamaño del producto
Sentido	227-250	5' GAA TTC CCA TGG CTG AGG ACA TCA TGG CCA CT 3'	55° C	
Anti-sentido (1)	1803-1830	5' ACC GGT AAG TTC TGC AGC TCC TTT TCT TTT C 3'		1620 pb
Anti-sentido (2)	1810-1834	5' CTT TGG GAA GTT CTG CAG CTT T 3'		1600 pb
Anti-sentido (3)	1814-1836	5' CGT CGA CGC CTT TGG GAA GTT CTG CAG CTC 3'		1018 pb

A fin de comprobar que el inserto estuviera en todas las colonias que crecieron, se realizó una PCR para cada una de ellas, utilizando como cebadores los oligonucleótidos empleados en experimentos anteriores para detectar la expresión del receptor P2Y8 en diferentes tejidos de la rana *Xenopus*. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 1% para seleccionar las clonas transformadas.

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento interno del ADNc del receptor P2Y8**

Oligonucleótido	Secuencia	Temperatura de Alineación	Tamaño del producto
Sentido	5' GTT CCC TTG TCA TGA GTC 3'	53°C	575 pb
Anti-sentido	5' TGC TGC CGG TCT CCT ACA 3'		

Para extraer los insertos de interés, los plásmidos se linearizaron mediante restricciones enzimáticas, utilizando inicialmente Sall para el plásmido pCR4-TOPO-Y8.1; o Agel, para el pCR4-TOPO-Y8.2 y el pCR4-TOPO-Y8ΔC y, a continuación EcoRI, para posteriormente analizar los productos de las restricciones en geles de agarosa al 1%, como control de las reacciones.

De las colonias seleccionadas, se purificaron los plásmidos conteniendo la secuencia del receptor P2Y8 y la versión truncada, P2Y8 $\Delta$ C y se analizó la secuencia de ambos insertos para confirmar que no existieran mutaciones.

### ***Clonación del ADNc del receptor P2X8 en el vector pEGFP-N1***

Dado que cada uno de los oligonucleótidos con los que amplificaron las secuencias del P2Y8 se diseñaron con sitios de restricción para las enzimas EcoRI (sentido), Sall (antisentido 1) y AgeI (antisentido 2 y 3), se utilizaron estas enzimas para extraer los insertos de interés del plásmido *pCR4-TOPO*.

Los resultados de cada digestión fueron verificados analizando los productos en geles de agarosa al 1%, a partir de los cuales se purificaron los insertos P2Y8 completo y P2Y8 $\Delta$ C.

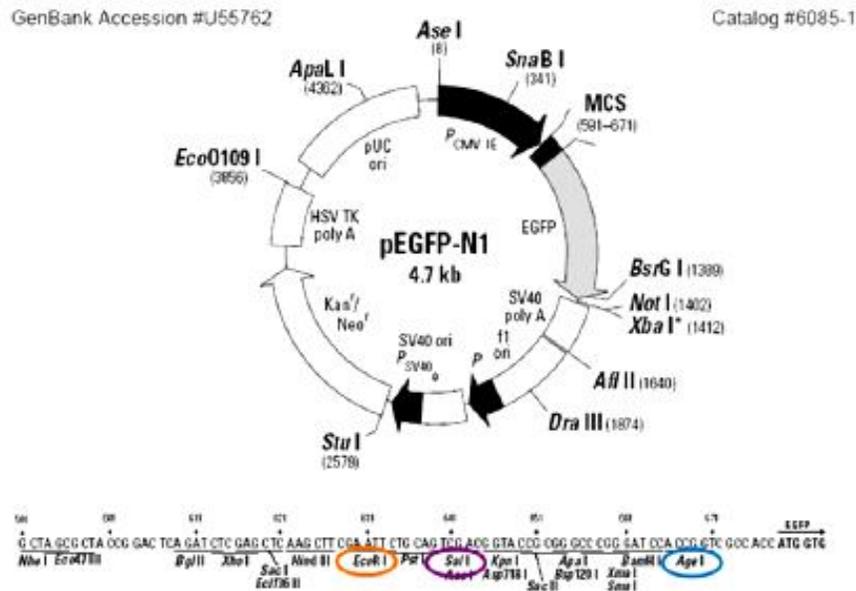
A fin de poder expresar los receptores en líneas celulares de mamífero, los insertos extraídos se subclonaron en el vector de expresión pEGFP-N1. Para ello, el vector fue digerido con las mismas enzimas de restricción anteriormente utilizadas y posteriormente fue ligado el ADN purificado. Las ligaciones fueron utilizadas para transformar bacterias *E. coli*, las colonias transformadas fueron seleccionadas por PCR utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar únicamente la construcción quimérica, pues uno de los cebadores fue diseñado en la secuencia del ADNc de P2Y8 y el otro en la secuencia que codifica a la EGFP.

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para detectar la expresión del receptor P2Y8 fusionado a la proteína EGFP en las colonias transformadas.**

Oligonucleótido	Secuencia	Temperatura de Alineación	Tamaño del producto
Sentido	5' GTT CCC TTG TCA TGA GTC 3'	59°C	P2Y8-GFP (1665pb)
Anti-sentido	5'CTT GCC GTA GGT GGC ATC 3'		P2Y8 $\Delta$ COOH-GFP (1063pb)

A partir de estas colonias se purificó 1-2  $\mu$ g de cada plásmido conteniendo cada una de las construcciones y se analizó la secuencia para comprobar que no existieran mutaciones y que el marco de lectura era el correcto.

De este modo, el ADNc codificante para el P2Y8 quedó ubicado con la secuencia de la EGFP hacia el sitio correspondiente al carboxilo terminal y bajo la transcripción del promotor de citomegalovirus (CMV), incluido en dicho vector.



**Figura D.** Esquema del vector pEGFP-N1, en el que se muestran la ubicación del promotor de citomegalovirus (CMV) y de los sitios de restricción EcoRI (naranja), Sall (púrpura) y AgeI (azul).

### **Transfección de líneas celulares.**

Para la transfección de las células con el ADNc del receptor P2Y8-GFP se utilizaron dos métodos: Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*), y fosfato de calcio (CaCl<sub>2</sub>). En ambos casos, se utilizaron células HEK293 que fueron transfectadas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante utilizando placas de 12 pozos. Como control positivo de la transfección se utilizó el vector *pEGFP-N1* vacío.

El segundo método utilizado, requirió que las células HEK293 en cultivo fueran privadas de suero durante 4 horas previas a la adición de una solución que contenía ADN(2ug), 125mM de CaCl<sub>2</sub> y buffer HEPES 1x, en una proporción 1/10 con respecto al volumen total del medio de cultivo. Para su preparación, a la solución de ADN+CaCl<sub>2</sub> se le agregó un volumen igual de solución tampón HEPES 2x (Hepes 2.1mM, NaCl 13.7mM, KCl 50uM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 75uM, dextrosa 500uM) y esto fue añadido en el medio de cultivo a las células. A las 24 hrs. de la transfección, las células se sembraron en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro para su posterior

lisado y extracción de RNA u obtención de proteínas totales, sustituyendo el medio de cultivo por medio de selección (DMEM con 10% de SFB adicionado con geneticina (*G/BCO*), a fin de seleccionar las células que fueron transfectadas. La eficiencia de la transfección fue evaluada por microscopía de fluorescencia.

### ***Establecimiento de colonias monoclonales estables.***

Tras cuatro semanas de cultivo en medio de selección, las células transfectadas se resembraron a muy baja confluencia (~5%) en una caja de cultivo de 10 cm de diámetro, con la finalidad de obtener colonias monoclonales aisladas.

Una vez que alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 40%, se ubicaron las colonias con mayor fluorescencia y se trataron con 50 µl de tripsina-EDTA, se cosecharon y se resuspendieron 100 células en 10 ml de medio de selección. De la suspensión celular, se sembraron 100 µl en cada uno de los pozos de placas de 96 pozos y se les permitió proliferar durante 2 semanas observándolas al microscopio cada tercer día. Finalmente se seleccionaron las células de los pozos en los que apareció solamente un grupo de células, mismas que se cosecharon y se resembraron en cajas de 12 pozos.

### ***Análisis de las células por microscopía confocal de fluorescencia.***

Para el análisis de la distribución de la proteína quimérica P2Y8-GFP se sembraron 50,000 células en cubreobjetos tratados con polyD-Lisina. A las 24 hrs de la siembra, se extrajo el medio de cultivo, se lavaron con PBS 1x y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 25 min. Posteriormente, el formaldehído fue lavado y neutralizado con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) durante 25 min. Tras lavar el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  las células fueron permeabilizadas con tritón al 0.2% durante 10 min y a continuación se les tiñeron los núcleos con yoduro de propidio disuelto en PBS 1x (1:1000) durante 5 min, que fue lavado antes de montar las preparaciones en medio *Vectashield* (Laboratorios *Vector*®, CS USA). Todos los lavados con PBS 1x se realizaron por triplicado.

Finalmente las preparaciones fueron observadas mediante microscopía confocal utilizando una longitud de onda de 536 nm y un filtro de detección de 617 nm, para excitar el yoduro de propidio (núcleos), que tiene un rango de emisión máximo de 595 nm; Para excitar la EGFP, cuya longitud máxima de emisión es de 507 nm, se utilizó una longitud de onda de 484 nm y un filtro de 518 nm.

### ***Análisis del transcrito por RT-PCR.***

Con el fin de detectar la presencia del transcrito del receptor completo (P2Y8) y truncado (P2Y8 $\Delta$ C) fusionados a la EGFP, se extrajo el RNA total de células transfectadas con los plásmidos indicados. Posteriormente, se sintetizó ADNc utilizando 5  $\mu$ g de RNA, 1  $\mu$ g de oligo dT, inhibidor de RNasas y 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa (PROMEGA). Utilizando este ADNc como molde, se realizó PCR utilizando los oligonucleótidos y las condiciones descritas a continuación.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el ADNc del receptor P2Y8 fusionado a la proteína EGFP**

Oligonucleótido	Secuencia	Temperatura de Alineación	Tamaño del producto
Sentido	5' GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG 3'	55°C	$\beta$ -Actina (238 pb)
Anti-sentido	5' GGT CTC AAA CAT GAT GTC GG 3'		
Sentido	5' GA ATT CCC ATG GCT GAG GAC ATC ATG 3'	59°C	P2Y8-GFP (1665pb)
Anti-sentido	5'CTT GCC GTA GGT GGC ATC 3'		P2Y8 $\Delta$ C-GFP (1063pb)

Como controles negativos se utilizaron células transfectadas con el vector *pEGFP-N1* vacío ( $V/V_0$ ), células no transfectadas (*Wt*), un control de cada reacción en los cuales se agregó agua en lugar de la enzima retrotranscriptasa (-RT para la retrotranscripción) o del ADNc (para la PCR). Asimismo, como control de un gen constitutivo se amplificó el ADNc de la  $\beta$ -actina.

### ***Análisis de la proteína por Western blot.***

Las células transfectadas con las construcciones P2Y8-GFP, P2Y8 $\Delta$ C-GFP, el vector *pEGFP-N1* vacío (*V/V<sub>0</sub>*) o células no transfectadas (*Wt*), fueron lisadas con RIPA-SDS (25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), los homogenados fueron centrifugados 10 min a 10000 rpm, con el fin de eliminar fracciones insolubles. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y el volumen conteniendo 50  $\mu$ g de proteínas totales, fue fraccionado en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 10% de acuerdo con la técnica SDS-PAGE (electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida). Posteriormente, las proteínas fueron equilibradas en solución de transferencia (Tris base 400mM, glicina 52mM, CH<sub>3</sub>OH 20%) y transferidas a membranas de PVDF, incubadas a 4°C con anticuerpo primario anti-EGFP (Invitrogen, dilución 1:2000) por una noche y 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Zymed 65-6120, 1:15,000). La señal de unión de los anticuerpos fue visualizada por quimioluminiscencia.

### ***Ensayos funcionales***

Tanto para los ensayos de internalización del receptor como para los registros de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, se cultivaron células HEK293 transfectadas de forma transitoria con el método de CaCl<sub>2</sub>, en cubreobjetos redondos de cristal, recubiertos con poly-D lisina. A las 24 horas de la transfección, las células se sembraron en los cubreobjetos y al día siguiente se extrajeron de la caja de cultivo y se colocaron en una cámara de registro con perfusión continua acoplada a un microscopio de epifluorescencia invertido (*Olympus IX70*) equipado con una lámpara de xenón y una cámara fotográfica de alta velocidad (*Media Cybernetics Evolution® QE*).

Para los ensayos de internalización de receptores, los cubreobjetos conteniendo los cultivos celulares fueron colocados en la cámara de registro, con perfusión continua de solución de Krebs (NaCl 150mM, KCl 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, glucosa 4mM y HEPES 10mM, pH 7.4); las células fueron estimuladas con 100  $\mu$ M de ATP durante 1 minuto

y los cambios en el patrón de fluorescencia fueron registrados en una serie de fotografías con una exposición de 500 ms, cada 15 segundos, durante 15 minutos, con el objetivo 20x.

Para el registro de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, al inicio de cada ensayo, las células fueron fotografiadas tanto en campo claro como en fluorescencia. Posteriormente, fueron cargadas con Fluo4-AM 5  $\mu\text{M}$  (*Molecular Probes*®, OR USA via *Invitrogen Corp.*) y ácido plurónico al 0.1%, en solución de *Krebs* con albúmina al 0.05%, durante 15 min, en condiciones de cultivo. Finalmente, por medio de perfusión continua con *Krebs*, las células fueron estimuladas con 100  $\mu\text{M}$  de ATP durante aproximadamente durante 50 s. Los cambios en sus patrones de fluorescencia fueron registrados con una cámara fotográfica de alta velocidad para experimentos *in vivo* que capturó 250 imágenes continuas, expuestas por 100 ms durante aproximadamente 90 s. Finalmente la intensidad de señal de las imágenes fue analizadas utilizando el *software ImageJ*.

## VII. RESULTADOS

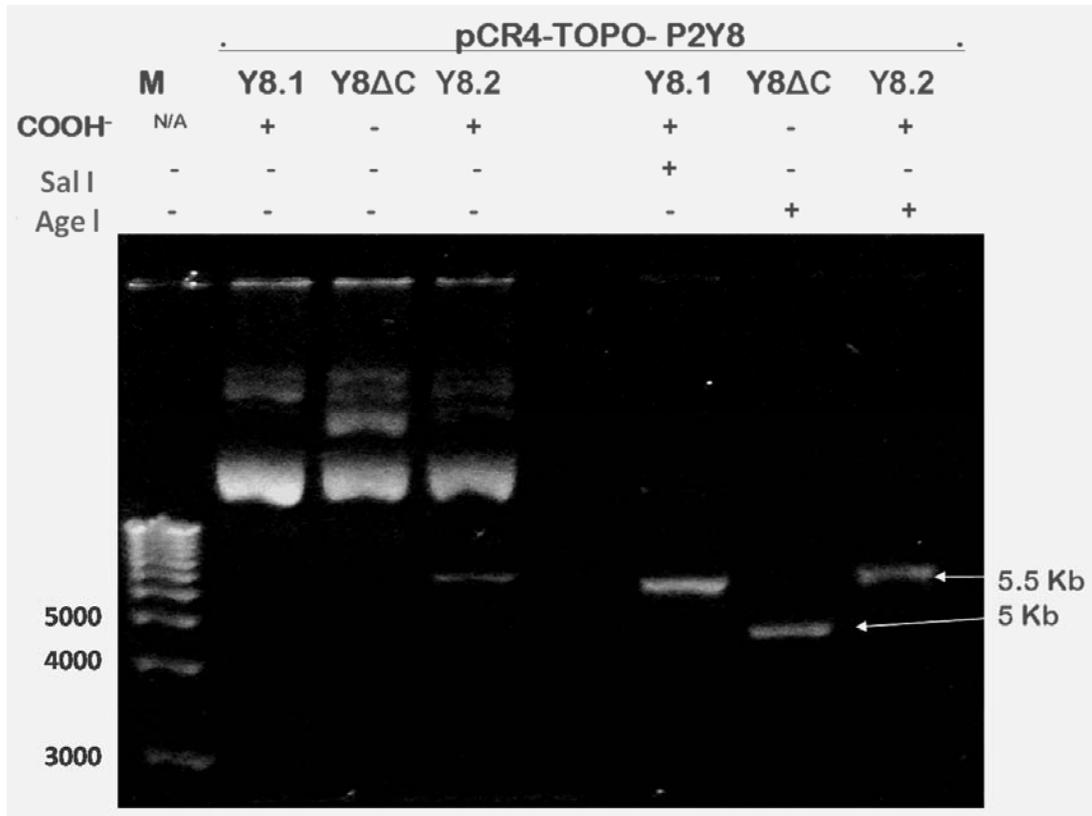
### ***Obtención del ADNc del receptor P2Y8.***

Para obtener la secuencia codificante del receptor, fue necesario amplificarlo mediante PCR, utilizando como templado un ADNc preexistente que había sido clonado en el vector de expresión en *Xenopus*, *pXen* y los oligonucleótidos descritos en los métodos. Los productos amplificados fueron de 1.620 Kb (P2Y8) y 1.018 Kb (P2Y8 $\Delta$ COOH) de acuerdo a lo predicho. (Figura 1).

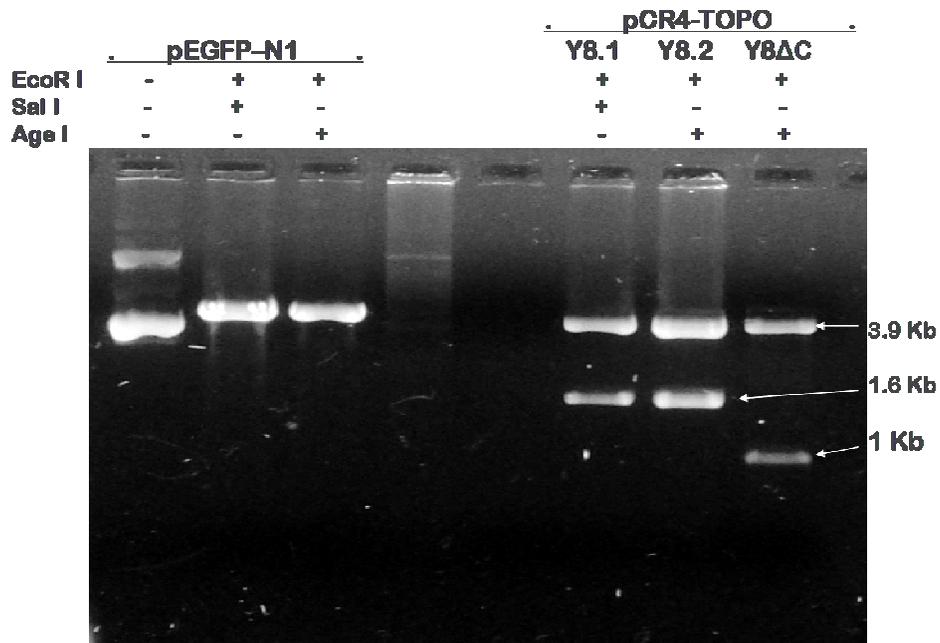
Los productos linearizados con enzimas de restricción fueron de 5.5 Kb (pCR4-TOPO-Y8.1 y pCR4-TOPO-Y8.2) y 5 Kb (pCR4-TOPO-Y8 $\Delta$ C), que corresponde con el tamaño esperado (Figura 1). Las dobles digestiones permitieron la escisión de los insertos. En los geles de agarosa pueden apreciarse dos bandas para cada caso, siendo las de mayor tamaño las correspondientes al plásmido *pCR4-TOPO* linearizado (3956 pb) y las de menor tamaño las correspondientes al receptor completo (1620 pb) o truncado (1018 pb). Por otra parte el vector *pEGFP-N1* fue digerido con Sall-EcoRI o AgeI-EcoRI para generar los extremos cohesivos e introducir los insertos (Figura 2).

Los fragmentos escindidos del vector pCR4-TOPO y el vector pEGFP-N1, fueron ligados, generando los plásmidos: pEGFP-N1-Y8.1, pEGFP-N1-Y8.2 y pEGFP-N1-Y8 $\Delta$ C.

Con los nuevos plásmidos se transformaron bacterias que generaron colonias en LB con agar y kanamicina; su transformación fue corroborada mediante PCR y fueron analizados en geles de agarosa al 1% (Figura 3). Se eligieron dos colonias que contenían el plásmido pEGFP-N1-Y8.1 (Figura 3, carriles 2 y 3); dos que contenían el pEGFP-N1-Y8.2 (Figura 3, carriles 6 y 7) y 2 con el pEGFP-N1-Y8 $\Delta$ C (Figura 3, carriles 11 y 12), todos ellos con la secuencia de la EGFP en el extremo 3'. Finalmente, se cultivaron las bacterias transformadas, se purificaron las construcciones con las secuencias de interés y se mandaron secuenciar, para comprobar que el ADNc de los receptores se encontrara en marco con la EGFP.

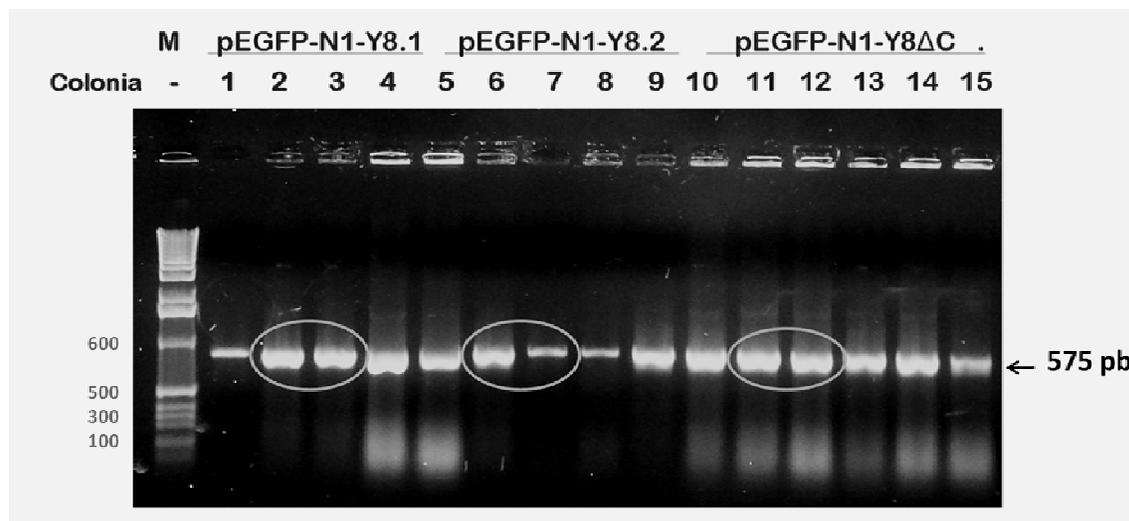


**Figura 1. Linearización de las construcciones.** En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular (M) en los carriles del segundo al cuarto están los plásmidos sin digerir y en los carriles subsecuentes las construcciones linearizadas. El cuadro superior indica la presencia o ausencia del COOH terminal en la construcción y la enzima de restricción utilizada.



**Figura 2. Extracción de las secuencias clonadas.** Productos de la digestión del vector pEGFP-N1 linearizado (Carriles 1 al 3) y fragmentos correspondientes al ADNc del receptor completo (Y8.1 ó

Y8.2) o truncado (Y8ΔC), extraídos del pCR4-TOPO. En el cuadro superior se especifica la construcción que fue cargada y las enzimas de restricción utilizadas.

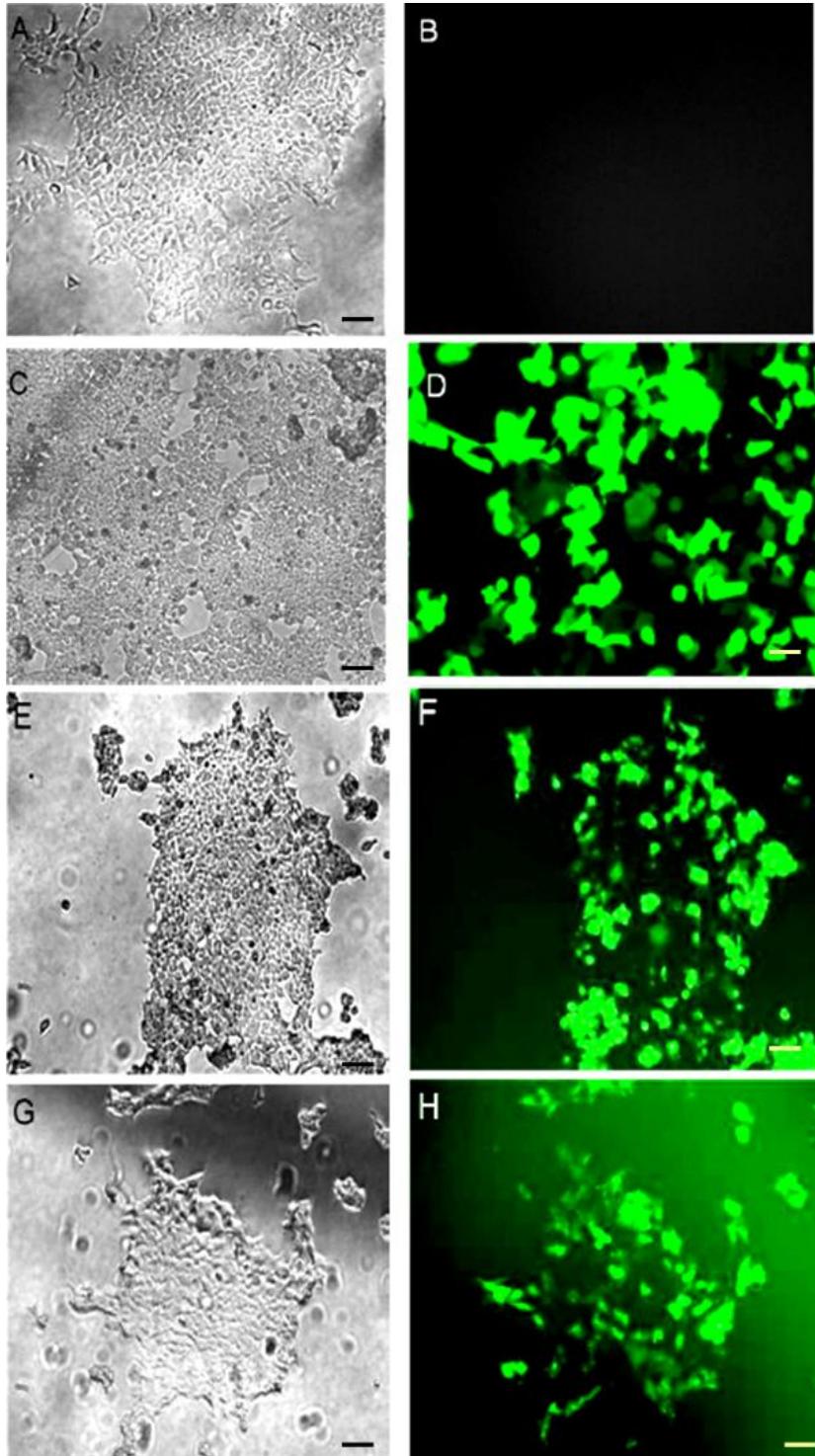


**Figura 3. PCR de bacterias transformadas con la secuencia del receptor P2Y8 fusionado a la EGFP.** Productos de la amplificación por PCR de un segmento de 575 pb del receptor P2Y8, realizada con bacterias *E. coli* transformadas con los plásmidos pEGFP-N1-Y8.1, pEGFP-N1-Y8.2 y pEGFP-N1- Y8ΔC.

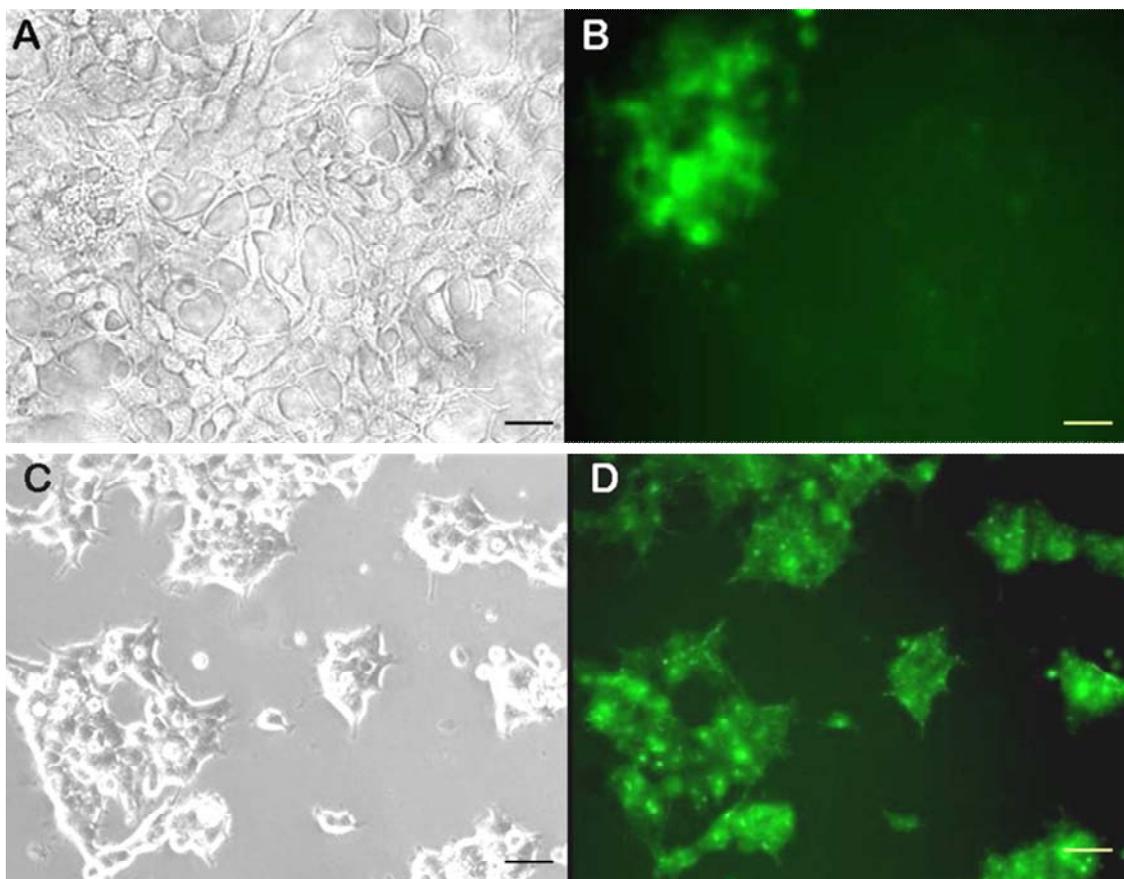
### ***Transfección de célula HEK293 con las construcciones.***

Con los plásmidos purificados se transfectaron células HEK293 y a las 48 horas se observó un porcentaje de aproximadamente el 40% de células fluorescentes (Figura 4). Adicionalmente a la fluorescencia de la proteína EGFP, las células proliferaban de manera adecuada en medio de selección DMEM + SFB10% + Geneticina.

En la mayoría de las células transfectadas con la construcción truncada (pEGFP-N1-Y8ΔC) se observó fluorescencia, característica que no se ha perdido con los pases de resiembra. Sin embargo, durante el proceso de selección y de establecimiento de colonias monoclonales estables, las células transfectadas con la construcción completa (pEGFP-N1-Y8.1), fueron perdiéndola conforme fueron siendo subcultivadas, desde una señal que se detectaba exclusivamente en células postconfluentes a las cuatro semanas de la transfección, hasta la casi completa desaparición de la señal (Figura 5).

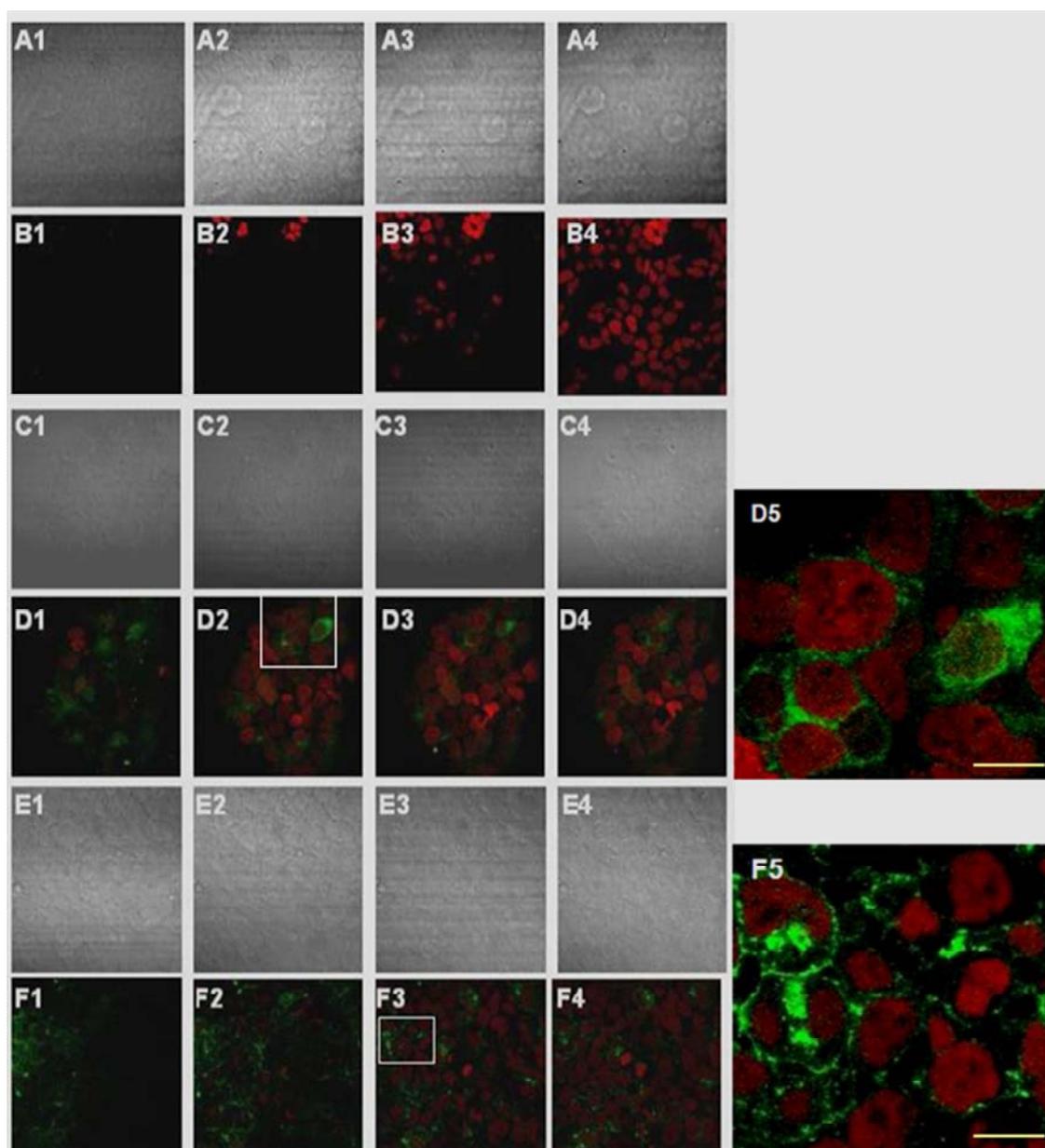


**Figura 4. Células HEK293 transfectadas.** A y B corresponden a células no transfectadas; C y D, células transfectadas con el vector vacío; E y F con la construcción completa (pEGFP-N1-Y8.1); G y H con la construcción truncada (pEGFP-N1-Y8 $\Delta$ C). Las muestras fueron observadas a una amplificación de 15x, las de la izquierda en campo claro y las de la derecha con fluorescencia. Barra de escala: 50 $\mu$ M.



**Figura 5. Selección de colonias estables.** A y B corresponden a células HEK293 transfectadas con el plásmido pEGFP-N1-Y8.1; C y D, células transfectadas con el pEGFP-N1- Y8ΔC. Las fotografías de la izquierda fueron tomadas en campo claro y las de la derecha con fluorescencia. Amplificación 20x. Barra de escala: 50μM.

Con el fin de analizar el patrón de expresión de ambas proteínas quiméricas se utilizó microscopía confocal. Para el caso del receptor P2Y8-GFP (pEGFP-N1-Y8.1) se observó una localización principalmente citoplásmica (Figura 6D1-5). Para el caso de la proteína P2Y8ΔCOOH-GFP (pEGFP-N1-Y8ΔC) la localización es periférica, indicando mayor probabilidad de localización en la membrana (Figura 6F1-5).

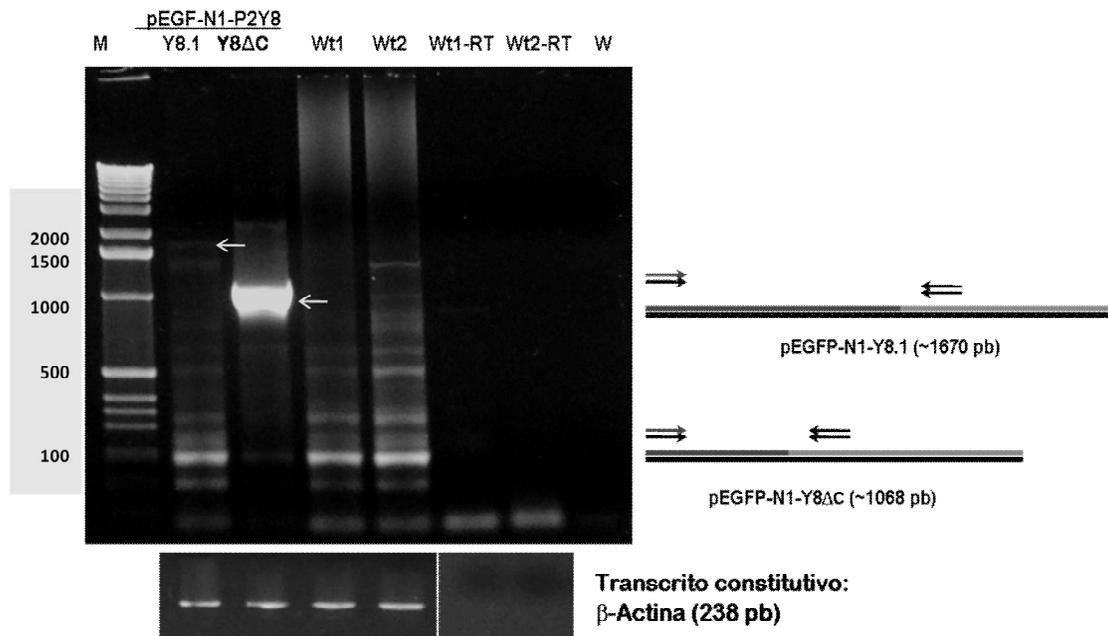


**Figura 6. Patrón de expresión de las construcciones P2Y8-GFP y P2Y8ΔC.** Los paneles superiores (A1-4y B1-4) corresponden a cortes ópticos de 1μM de grosor en células HEK293 Wt; los paneles de en medio (C1-4 y D1-4) son células transfectadas con la construcción P2Y8-GFP y los inferiores (E1-4 y F1-4) corresponden a las transfectadas con la construcción P2Y8ΔC-GFP. Las tomas fueron hechas con una amplificación de 63x con un objetivo de inmersión, con luz transmitida (paneles A, C, E) y con fluorescencia (paneles B, D y F). Las fotografías de la derecha (D5 y F5) son ampliaciones de las áreas enmarcadas en los rectángulos blancos. En verde se muestra la señal de la EGFP y en rojo los núcleos teñidos con ioduro de propidio. Barra de escala=20μM.

## Análisis de la expresión de las construcciones.

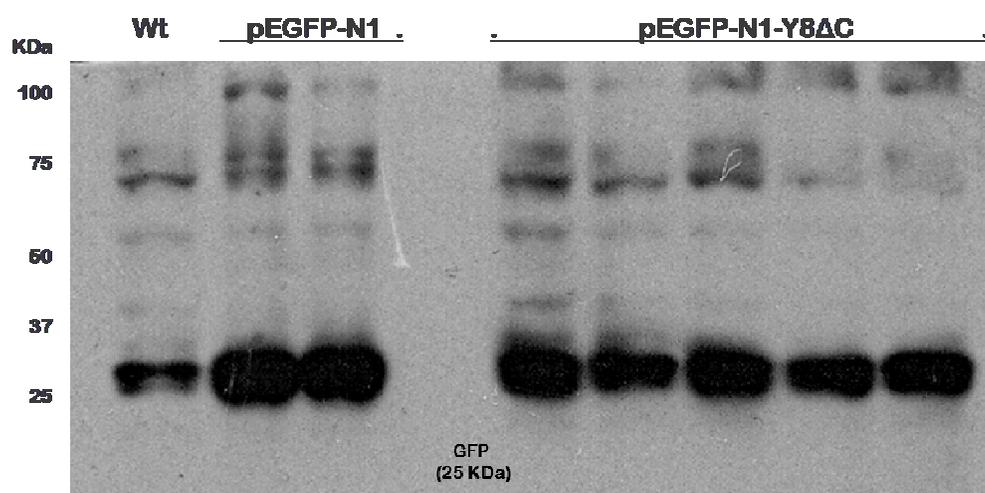
### Clonas con expresión estable

Con el fin de documentar la presencia del transcrito de ambas construcciones, se decidió extraer RNA total de colonias monoclonales transfectadas con los plásmidos pEGFP-N1-Y8.1 y pEGFP-N1-Y8 $\Delta$ C, para sintetizar ADNc y amplificar un segmento de los transcritos de las construcciones, utilizando un oligonucleótido sentido que se une al inicio de la secuencia del P2Y8 y un oligonucleótido antisentido complementario al inicio de la secuencia de la EGFP. Los tamaños de los productos de PCR fueron de 1670 pb para el pEGFP-N1-Y8.1 y de 1068 pb para el pEGFP-N1-Y8 $\Delta$ C; sin embargo, al analizarlos por electroforesis en gel de agarosa al 1% se observó que, la construcción truncada presentaban alta expresión, y que las secuencias completas tenían un nivel de expresión muy baja (Figura 7).



**Figura 7. Expresión de las construcciones transfectadas.** Panel superior, de izquierda a derecha: En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular (M); del segundo al octavo los productos amplificados por PCR de las células transfectadas con el pEGFP-N1-Y8.1, el pEGFP-N1-Y8 $\Delta$ C, no transfectadas (Wt1 y Wt2), y controles negativos de la retrotranscripción con células Wt (-RT) y de las PCR (W). Panel inferior: Expresión del gen constitutivo actina (238 pb).

A fin de confirmar que la fluorescencia observada en las células que si expresan la secuencia truncada correspondía con la presencia de la proteína quimérica, se analizaron por Western blot proteínas totales extraídas de cinco colonias monoclonales de células HEK293 transfectadas de forma estable, que fueron incubadas con un anticuerpo anti-EGFP. Sin embargo, la banda esperada, de aproximadamente 60 kDa, no se observó. En cambio, se observaron dos bandas muy evidentes con pesos de aproximadamente ~25 KDa, que corresponde al de la proteína EGFP (Figura 8).

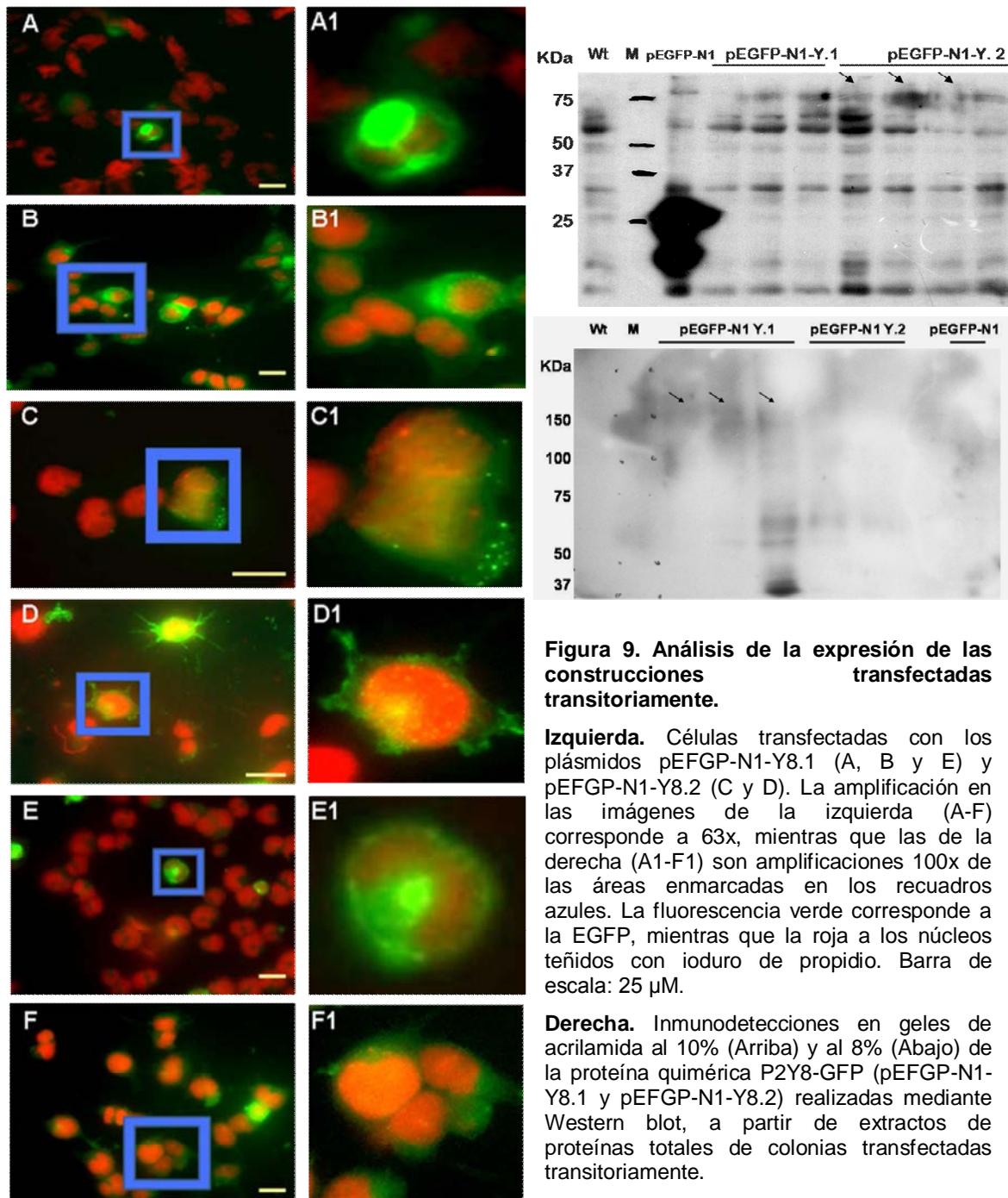


**Figura 8. Inmunodetección de las proteínas quiméricas.** Análisis de la expresión de la proteína quimérica pEGFP-N1-Y8 $\Delta$ C realizado mediante Western blot, a partir de extractos de proteínas totales de colonias transfectadas estables de origen monoclonal, incubadas con anticuerpo anti-EGFP.

### ***Transfecciones transitorias***

Nuestros datos indicaron que las células transfectadas con el plásmido pEGFP-N1-Y8.1 y pEGFP-N1-Y8.2 habían perdido la expresión de las construcciones completas, por ello tomamos la decisión de volver a transfectar –transitoriamente– células HEK293. En los nuevos cultivos transfectados se observó la expresión de ambas proteínas utilizando microscopía de epifluorescencia (Figura 9), además se extrajo RNA y proteínas totales, para analizar la expresión de las construcciones mediante RT-PCR y Western blot, como se había hecho anteriormente.

Para el Western blot se esperaban bandas de aproximadamente 85 KDa, que se observan muy débilmente. Buscando eliminar las señales inespecíficas del Western blot, se modificaron las condiciones de la inmunodetección; aún así no fue posible observar la señal a 85 KDa, puesto que solamente se detectó una con un peso molecular aproximado de 150 KDa (Figura 9).

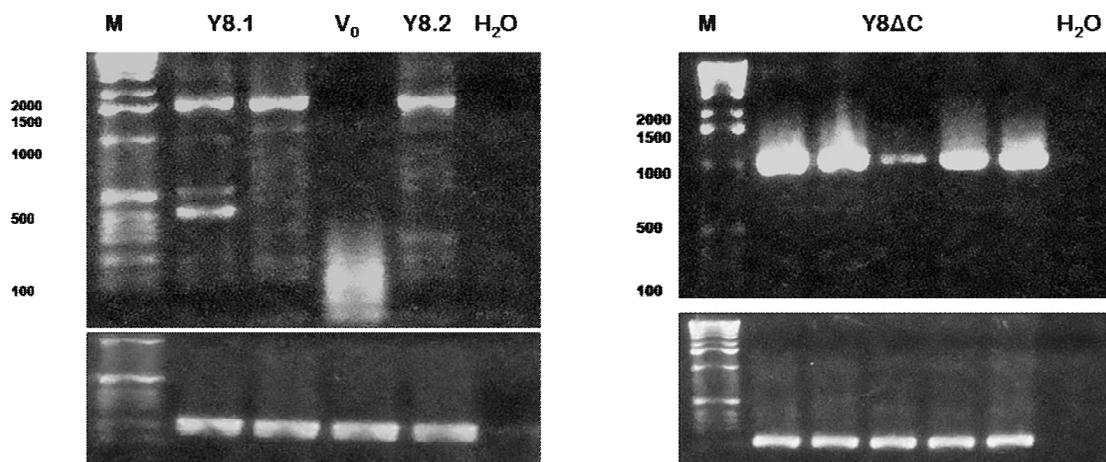


**Figura 9. Análisis de la expresión de las construcciones transfectadas transitoriamente.**

**Izquierda.** Células transfectadas con los plásmidos pEGFP-N1-Y8.1 (A, B y E) y pEGFP-N1-Y8.2 (C y D). La amplificación en las imágenes de la izquierda (A-F) corresponde a 63x, mientras que las de la derecha (A1-F1) son ampliaciones 100x de las áreas enmarcadas en los recuadros azules. La fluorescencia verde corresponde a la EGFP, mientras que la roja a los núcleos teñidos con yoduro de propidio. Barra de escala: 25 μM.

**Derecha.** Inmunodetecciones en geles de acrilamida al 10% (Arriba) y al 8% (Abajo) de la proteína quimérica P2Y8-GFP (pEGFP-N1-Y8.1 y pEGFP-N1-Y8.2) realizadas mediante Western blot, a partir de extractos de proteínas totales de colonias transfectadas transitoriamente.

Sin embargo, en la PCR se observan bandas que corresponden al tamaño esperado en las células tranfectadas tanto con las construcciones completas, como con las truncadas (Figura 10).



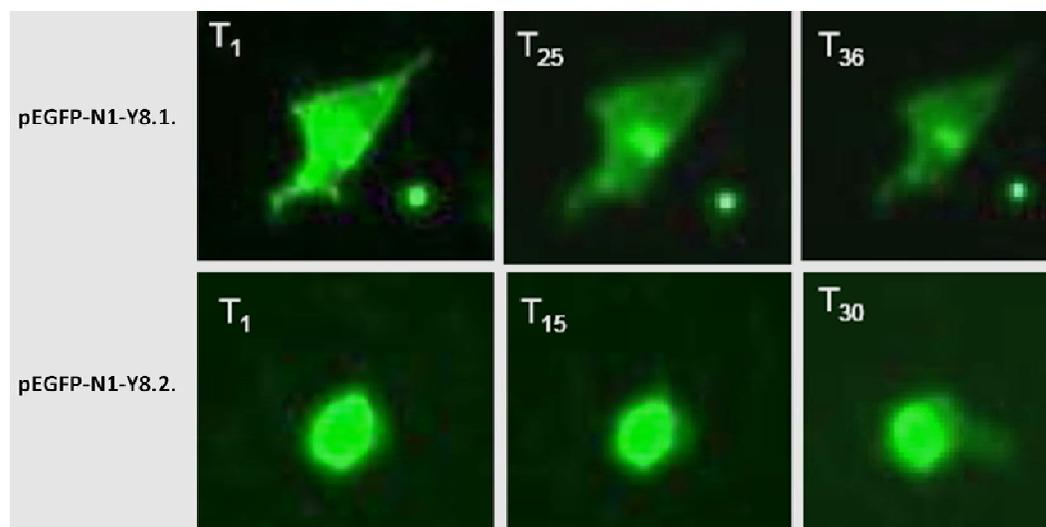
**Figura 10. Expresión transitoria de las construcciones tranfectadas en células HEK293.** En el primer carril de cada gel se cargó el marcador de peso molecular (M); del segundo al quinto, los productos amplificados por PCR de las células HEK293 tranfectadas con los plásmidos pEGFP-N1-Y8.1, pEGFP-N1-Y8.2 y pEGFP-N1-Y8ΔC. Panel inferior: Expresión del gen constitutivo actina (238pb).

### ***Funcionalidad de las construcciones***

Un mecanismo general de regulación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) es la internalización. Se sabe que, una vez ocupado por su agonista, los receptores son fosforilados en aminoácidos de serina y treonina en su extremo carboxilo terminal por cinasas específicas de los GPCR, y esta fosforilación sirve como reconocimiento para las arrestinas, proteínas que inician la internalización del complejo en vesículas recubiertas de clatrina (Shenoy y Lefkowitz 2011). Con relación al receptor P2Y8, este mecanismo no ha sido estudiado, por lo que diseñamos experimentos dirigidos a determinar si este receptor se internaliza y a través de este fenómeno determinar la funcionalidad del receptor clonado. Para ello, las células HEK293 tranfectadas transitoriamente con el receptor completo (pEGFP-N1-Y8.1 y pEGFP-N1-Y8.2), se colocaron en una cámara con perfusión

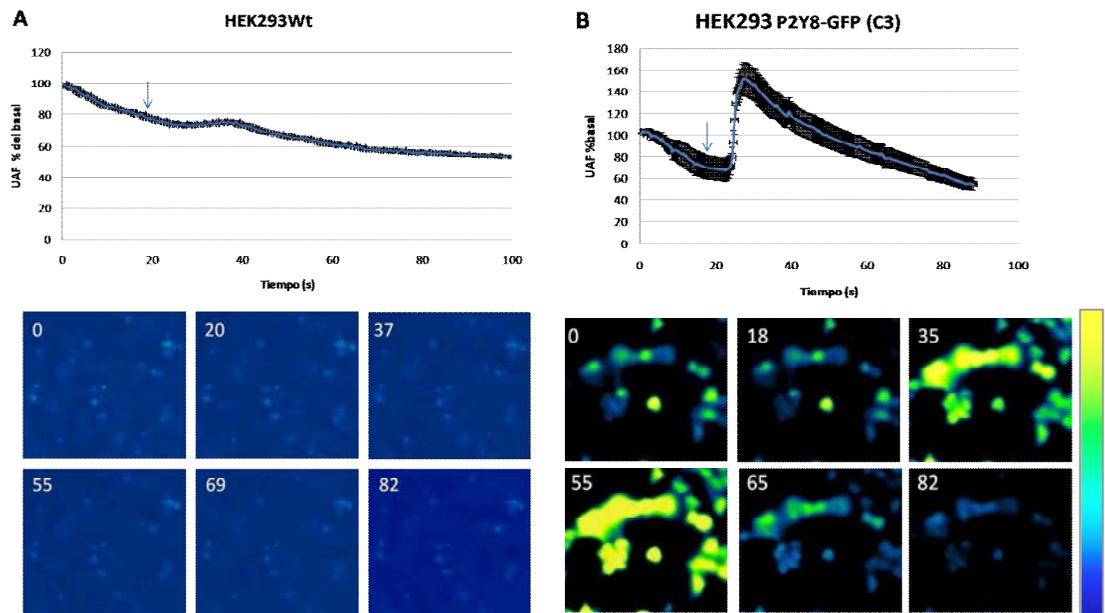
constante en donde fueron estimuladas con ATP 100  $\mu$ M y fueron fotografiadas antes y después de estímulo.

Como puede observarse en la figura 11, la estimulación de las células transfectadas parece inducir un cambio en la localización celular de la señal fluorescente, sugiriendo que el P2Y8 se podría internalizar en respuesta al agonista.



**Figura 11. Efecto del ATP en la localización del receptor P2Y8.** Cambios observados en células HEK293 transfectadas con las construcciones pEGFP-N1-Y8.1 y pEGFP-N1-Y8.2, ante la exposición al agonista (ATP 100  $\mu$ M). El subíndice numérico ubicado junto a las letras “T” hace referencia al número de toma correspondiente. Imágenes tomadas en un microscopio de epifluorescencia, con un objetivo de aire 30x.

Se ha descrito que el receptor P2Y8 está acoplado preferencialmente a la vía de fosfoinosítidos- $\text{Ca}^{2+}$  (Bogdanov et al. 1997 y Romero 2006). Con el fin de confirmar la funcionalidad de estos receptores quiméricos se realizaron registros de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células HEK293. La estimulación con ATP de las células transfectadas con la construcción pEGFP-N1-Y8.1 produjo un incremento transitorio de la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de 160% del basal, mientras que las células transfectadas con el vector vacío no generaron respuesta. Las respuestas se observaron cuando las células tenían menos de 8 pases en cultivo (Figura 12). Este resultado sugiere que la construcción pEGFP-N1-Y8.1 transfectada en células HEK293 sintetiza de forma adecuada el receptor y éste es insertado en la membrana de las células, en donde pueden ser activados por la unión de ATP, lo que provocó el aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.



**Figura 12. Liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular en células transfectadas.** Paneles superiores: Gráficas representativas de la liberación Ca<sup>2+</sup> intracelular en células HEK293 Wt (A) o transfectadas con el P2Y8-GFP C3 (B) ante la estimulación con el agonista. Paneles inferiores: Tomas representativas de los registros a partir de los cuales se obtuvieron los datos graficados. Las flechas azules indican el momento en el que comenzó la estimulación y los números que aparecen en la esquina superior izquierda de las fotografías el tiempo (s) transcurrido desde el inicio del registro. UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia.

## VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se realizaron construcciones del receptor P2Y8 de *Xenopus laevis* completo y truncado en la región carboxilo terminal, fusionados a la proteína EGFP que posteriormente fueron transfectados en células HEK293. El receptor completo, expresado heterológamente de forma transitoria, induce la liberación de calcio intracelular en respuesta al ATP, lo que permitió sugerir que es funcional.

El receptor purinérgico P2Y8 ha sido involucrado en las respuestas eléctricas nativas inducidas por ATP en el folículo de *X. laevis* (Romero, 2006; Arellano *et al.*, 2009). Algunos datos generados en nuestro laboratorio sugieren que dicho receptor podría funcionar estableciendo interacciones con otros receptores purinérgicos acoplados a proteínas G como una hetero-oligomerización con un receptor A2 de adenosina (Arellano *et al.*, 2009). Estos mecanismos de regulación de función, han sido previamente descritos para otros receptores purinérgicos.

Con el fin de estudiar estos mecanismos se decidió iniciar el desarrollo de una estrategia fundamental basada en la fusión de estos receptores con proteínas fluorescentes y su expresión en modelos heterólogos. Para estudiar su dinámica y sus interacciones con otras proteínas por métodos de microscopía. En los estudios de la oligomerización, el acoplamiento de los GPCR con proteínas fluorescentes es una técnica directa que permite monitorear en tiempo real la formación de complejos dinámicos de estos receptores en células vivas y, a diferencia de otras aproximaciones bioquímicas como la coimmunoprecipitación, no requiere de la solubilización de las membranas con detergentes, lo que en ocasiones puede provocar la destrucción de estas asociaciones proteicas (Pfleger & Eidne, 2005), además de que su resolución de la localización subcelular es menos limitada.

Las proteínas quiméricas formadas por los receptores fusionados a proteínas fluorescentes pueden utilizarse para métodos de alta resolución tales como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada, no sólo para estudiar la oligomerización entre GPCRs,

sino también para monitorear el acoplamiento de dichos receptores con las proteínas G, su asociación con otras proteínas intracelulares involucradas en su función y regulación, como la adenilato ciclasa y el reclutamiento de la  $\beta$ -arrestina, interacciones que permiten elucidar las funciones celulares de estos receptores (Overton & Blumer 2002; Böhme & Beck-Sickinger, 2009). Con base en lo anterior, y dado que usualmente en su medio nativo no se expresan en cantidad suficiente para caracterizarlos de forma adecuada, determinar la funcionalidad de los GPCRs en modelos heterólogos es fundamental.

El primer paso de este proyecto consistió en el diseño y construcción de los ADNcs para las proteínas quiméricas, P2Y8-GFP y P2Y8 $\Delta$ C-GFP. Experimentalmente, se ha observado con otros GPCR que la fusión de la EGFP en el extremo COOH intracelular no interfiere con la unión del agonista y en la mayoría de los casos mantiene un acoplamiento correcto a la proteína G (Bader & Beck-Sickinger, 2004). En consecuencia se tomó la decisión de realizar las fusiones por el extremo carboxilo terminal.

Inicialmente, las construcciones realizadas, fueron analizadas utilizando enzimas de restricción y mediante análisis *in silico* de la secuencia. Los patrones de restricción fueron los esperados. Respecto a la secuencia se observó que no existieran cambios de nucleótidos con respecto a la secuencia esperada, que no hubiese pérdida o ganancia de nucleótidos y que el marco de lectura fuera el correcto. Los resultados obtenidos indican que los ADNcs codificantes del receptor, tanto completo (P2Y8-GFP) como truncado (P2Y8 $\Delta$ COOH-GFP), quedaron en el marco de lectura correcto con la EGFP y que no presentaban ningún cambio con respecto a la secuencia esperada.

A continuación se llevó al cabo la expresión de dichas construcciones en células HEK293. Utilizamos este modelo celular porque está plenamente caracterizado que la eficiencia de transfección y la capacidad de expresión son de las más adecuadas para este tipo de estudios (Ramsay *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2006). El análisis de la expresión se realizó por microscopía de fluorescencia, RT-PCR y Western blot, sobre clones de expresión estable y células con expresión transitoria.

El análisis de la presencia de los transcritos mediante RT-PCR indicó que las células transfectadas con estas construcciones tienen un buen nivel de expresión, durante

los primeros días post-transfección (expresión transitoria). Sin embargo, las células transfectadas con las construcciones completas del P2Y8 acoplado a la proteína EGFP, perdieron la expresión del receptor durante el proceso de selección; los datos obtenidos por *Western blot* y microscopía confocal confirmaron estas observaciones, por lo que no fue posible obtener clones que expresaran de manera estable la proteína P2Y8-GFP.

Es posible que la expresión del receptor P2Y8 tuviera efectos citotóxicos sobre células de mamífero. Así, aquellas células en las que su secuencia se hubiera integrado eficientemente en el genoma celular, pudieron haber muerto, a diferencia de otras células en las cuales el vector hubiera sido abierto en algún sitio de dicha secuencia, truncándola y evitando su expresión, las cuales, al conservar el *cassette* de resistencia a la Geneticina, se seleccionaron. Sin embargo, lo anterior tendría que comprobarse mediante métodos experimentales específicos, por ejemplo cultivar las células transfectadas en presencia de antagonistas de los receptores P2Y o de apirasa, una potente nucleotidasa (Handa & Guidotti, 1996; Wu *et al.*, 2007; Lazarowski & Schwarzbaum, 2009).

Por otra parte, el receptor P2Y8 truncado se expresa eficientemente. Dada la ausencia del carboxilo terminal en las construcciones, esta variante pudo haber provocado que el P2Y8 no fuera funcional. Al carecer de funcionalidad, las células que lo hubieran integrado eficientemente en su genoma pudieron expresarlo, proliferar eficazmente y haberse seleccionado, como se muestra en el análisis de la localización celular de ambas proteínas por microscopía, donde se observa que el P2Y8 $\Delta$ C-GFP presenta una localización periférica, sugiriendo que podría ubicarse en la membrana plasmática.

Hasta este punto nuestros datos sugirieron que al menos en las transfecciones transitorias es posible detectar la expresión de P2Y8-GFP. El análisis de la distribución de las proteínas quiméricas por microscopía de fluorescencia permitió determinar que P2Y8-GFP se expresa con una localización principalmente citoplásmica, pero en algunos casos es posible detectarla presumiblemente en la membrana y formando *clusters* (Figura 9 D). Esto sugirió que la proteína podría ser funcional.

Para identificar la proteína recombinante realizamos *Western blot* utilizando anticuerpos dirigidos contra la EGFP, con esta estrategia identificamos una proteína de  $\approx 140$  kDa en los extractos de células transfectadas, aunque el peso de la proteína recombinante deducido de su secuencia de aminoácidos es de 85 kDa, la banda detectada puede estar reflejando modificaciones postraduccionales que afectan su migración electroforética. Esta información debe ser corroborada, por ejemplo realizando la inmunodetección en extractos que han sido tratados con glicosilasas y/o fosfatasas.

No obstante, los registros de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, indican la presencia de receptores funcionales tipo P2Y en las células HEK293 transfectadas, que no se encuentra en las células *Wt* puesto que, ante la estimulación con ATP, en las primeras se observó una respuesta típica y de gran amplitud, que no se presentó en las segundas.

En el mismo sentido, los análisis de internalización parecen indicar que en algunas células transfectadas se observan cambios que sugieren una posible internalización del P2Y8 en respuesta al agonista, fenómeno de desensibilización ampliamente descrito es este tipo de receptores. Aún así, para corroborar esta posibilidad, es necesario realizar ensayos más específicos ya que la cantidad de células fluorescentes en las que se observaron cambios fue muy baja.

Pese a ello, la mayor parte de la señal correspondiente a los receptores quiméricos se observaba en el citoplasma, por lo que puede ser que este receptor necesite de la presencia del receptor A2 para que su maduración y transporte desde el retículo endoplásmico a la membrana se lleve al cabo, como se ha demostrado que sucede con otros oligómeros de GPCRs (Reddy & Corley, 1998; Issafras *et al*, 2002; Overton & Blumer, 2002; Terrillon *et al*, 2003;). Así al no estar presente el receptor de adenosina, el incorrecto plegamiento del P2Y8 pudo haber activado respuestas de estrés celular en el retículo endoplásmico, como la UPR (*Unfolded Protein Response*) o la HSR (*Heat Shock Response*) que, al no poderse resolver, traerían consigo el procesamiento del receptor o la inducción de la apoptosis.

Al respecto, la gran mayoría de los estudios realizados con proteínas fusionadas a péptidos fluorescentes que se reportan en la literatura aluden a casos exitosos; no obstante, existen algunos ejemplos, como los reportados por O'Malley y

colaboradores (2009), quienes analizaron la expresión y la localización subcelular de doce GPCRs expresados de forma heteróloga en levadura, de los cuales solamente uno logró ser finalmente expresado en la membrana celular donde, además, demostró ser funcional. Estas observaciones sugieren que es necesario continuar buscando un sistema de expresión idóneo.

Datos generados en nuestro laboratorio muestran que cuando esta construcción es expresada en ovocitos de *Xenopus laevis* es funcional, como lo demuestra su capacidad para inducir una corriente denominada  $F_{Cl}$  de manera semejante a receptores P2Y8 Wt, esta evidencia sugiere que una de las posibles opciones para obtener una expresión eficiente de P2Y8-GFP sería utilizar líneas celulares de *Xenopus* o de algún organismo filogenéticamente más cercano, por ejemplo de pez cebra.

En resumen nuestros datos indican que las construcciones P2Y8-GFP y P2Y8 $\Delta$ COOH-GFP se realizaron adecuadamente y que es posible expresarlas heterológamente en células HEK293; no obstante que las células HEK293 no resultaron el sistema de expresión idóneo para la proteína de fusión P2Y8-GFP, los resultados obtenidos empleando este modelo sugieren que los receptores son funcionales.

## IX. CONCLUSIONES

Por medio del uso de técnicas de biología molecular fue posible obtener las secuencias codificantes del receptor P2Y8 de *Xenopus laevis* completo y truncado del COOH- e insertarlas en el vector *pEGFP-N1*, en marco con la proteína verde fluorescente (EGFP).

Asimismo fue posible transfectar con ellas células HEK293, resultando las transfecciones transitorias de mayor utilidad que las estables para evaluar su patrón de expresión en un sistema heterólogo.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal permitieron observar la fluorescencia emitida por la proteína P2Y8-GFP principalmente en el citoplasma y una pequeña fracción aparentemente en la periferia celular; sin embargo, con base en los resultados obtenidos, no es posible asegurar con total certeza que parte de las proteínas quiméricas se ubicaban en la membrana plasmática.

Finalmente, los ensayos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta a la estimulación con ATP, indican que el receptor expresado es funcional.

## X. LISTA DE FIGURAS

FIGURA A. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES PURINÉRICOS .....	4
FIGURA B. MODELO DE HETEROMERIZACIÓN ENTRE LOS RECEPTORES PURINÉRICOS A1 Y P2Y1, PROPUESTO POR <i>NAKATA ET AL (2001)</i> .....	10
FIGURA C. A. CORRIENTES GENERADAS EN FOLÍCULOS W.F. O E.T.R. ANTE LA ESTIMULACIÓN CON ADENOSINA O ATP.....	15
FIGURA D. ESQUEMA DEL VECTOR PEGFP-N1 .....	22
FIGURA 1. LINEARIZACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES. ....	28
FIGURA 2. EXTRACCIÓN DE LAS SECUENCIAS CLONADAS. ....	28
FIGURA 3. PCR DE BACTERIAS TRANSFORMADAS CON LA SECUENCIA DEL RECEPTOR P2Y8 FUSIONADO A LA EGFP .....	29
FIGURA 4. CÉLULAS HEK293 TRANSFECTADAS.....	30
FIGURA 5. SELECCIÓN DE COLONIAS ESTABLES .....	31
FIGURA 6. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES P2Y8-GFP Y P2Y8 .....	32
FIGURA 7. EXPRESIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES TRANSFECTADAS.....	33
FIGURA 8. INMUNODETECCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS.....	34
FIGURA 9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES TRANSFECTADAS TRANSITORIAMENTE. ....	35
FIGURA 10. EXPRESIÓN TRANSITORIA DE LAS CONSTRUCCIONES TRANSFECTADAS EN CÉLULAS HEK293.....	36
FIGURA 11. EFECTO DEL ATP EN LA LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR P2Y8 .....	37
FIGURA 12. LIBERACIÓN DE Ca <sup>2+</sup> INTRACELULAR EN CÉLULAS TRANSFECTADAS.....	38

## REFERENCIAS

---

- **Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA (2006).** Update and subclassification of the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281 – 341.
- **Arellano RO & Miledi R (1995).** Functional role of follicular cells in the generation of osmolarity-dependent Cl<sup>-</sup> currents in *Xenopus* follicles. *J Physiol.*; 488 ( Pt 2):351-7.
- **Arellano RO, Woodward RM, Miledi R (1996).** Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Ion Channels*; 4:203-59.
- **Arellano RO, Garay E, Vázquez-Cuevas F (2009).** Functional interaction between native G protein-coupled purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Proc Nat Acad Sci USA* 29; 106(39):16680-5.
- **Bader JE, Beck-Sickinger AG (2004).** Fluorescence resonance energy transfer to study receptor dimerization in living cells. *Methods Mol Biol*; 259:335-52.
- **Bogdanov YD, Dale L, King BF, Whittock N, y Burnstock G (1997).** Early Expression of a Novel Nucleotide Receptor in the Neural Plate of *Xenopus* Embryos. *Jour Biol Chem* 272 (19): 12583–12590.
- **Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G (1998).** Molecular cloning and characterization of rat P2Y<sub>4</sub> nucleotide receptor. *Br J Pharmacol*; 124(3):428-30.
- **Böhme I, Beck-Sickinger AG (2009).** Illuminating the life of GPCRs. *Cell Commun Signal*14; 7:16.
- **Bouvier, M (2001).** Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2, 274–286.
- **Boyer JL, Waldo GL, Harden TK (1997).** Molecular cloning and expression of an avian G protein-coupled P2Y receptor. *Mol Pharmacol*; 52(6):928-34.
- **Burnstock G (2006).** Historical review: ATP as a neurotransmitter, *Trends Pharmacol Sci* (27) 3, 166-174.

- **Burnstock G (2007).** Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64, 1471–1483.
- **Burnstock G (2008).** Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 575-590.
- **Burnstock G (2001).** Introductory overview of purinergic signalling. *Front Biosci (Elite Ed)* 1; 3:896-900.
- **Cobb BR, Ruiz F, King CM, Fortenberry J, Greer H, Kovacs T, Sorscher EJ, Clancy JP (2002).** A(2) adenosine receptors regulate CFTR through PKA and PLA(2). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 282(1):L12-25.
- **Communi D, Motte S, Boeynaems JM, Piroton S (1996).** Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol*; 317(2-3):383-9.
- **Dubey, RK (2001).** A(2b) receptors mediate the antimitogenic effects of adenosine in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 37, 716–721.
- **Eppig JJ (2001).** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122(6):829-38.
- **Ferré S, Ciruela F, Quiroz C, Luján R, Popoli P, Cunha RA, Agnati LF, Fuxe K, Woods AS, Lluís C, Franco R (2007).** Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *Sci World Jour*. Nov 2; 7:74-85.
- **Fiziola M (2010).** Increasingly accurate dynamic molecular models of G-protein coupled receptor oligomers: Panacea or Pandora's Box for novel drug discovery? *Life Sci*; 86: 590-597.
- **Franco R, Casadó V, Cortés A, Ferrada C, Mallol J, Woods A, Lluís C, Canela EI y Ferré S (2007).** Basic Concepts in G-Protein-Coupled Receptor Homo- and Heterodimerization. *Sci World Jour* 7(S2): 48–57.
- **Franco R, Casadó V, Cortés A, Mallol J, Ciruela F, Ferré S, Lluís C, Canela EI (2008).** G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br J Pharmacol*. Mar;153.
- **Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Watanabe, Watanabe N, Hirano H, Matsumoto M, Sasaki K (2007).** Electrophysiological and Pharmacological Characterization of the KATP

Channel Involved in the K<sup>+</sup>-Current Responses to FSH and Adenosine in the Follicular Cells of *Xenopus* Oocyte. *Jour Physiol Sci*, 57:1, 51–61.

- **George SR, O'Dowd BF, Lee SP (2002).** G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature Rev Drug Discovery*; 1(10):808-20.
- **Handa M, Guidotti G (1996).** Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun*; 218(3):916-23.
- **Haskó G, Csóka B, Németh Z, Vizi ES y Pacher Pál (2009).** A2B adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends Immunol*; 30 (6):263-270.
- **Holmes KD, Babwah AV, Dale LB, Poulter MO, Ferguson SS (2006).** Differential regulation of corticotropin releasing factor 1alpha receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases. *J Neurochem*; 96(4):934-49.
- **Hua X, Kovarova M, Chason KD, Nguyen M, Koller BH, Tilley SL (2007).** Enhanced mast cell activation in mice deficient in A2B adenosine receptor. *Jour Exp Med*; 204: 117-128.
- **Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbé-Jullié C, Bouvier M, Marullo S (2002).** Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem*; 277(38):34666-73.
- **Kennedy C, Qi AD, Herold CL, Harden TK, Nicholas RA (2000).** ATP, an agonist at the rat P2Y(4) receptor, is an antagonist at the human P2Y(4) receptor. *Mol Pharmacol*; 57(5):926-31.
- **Lazarowski ER, Boucher RC (2001).** UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol Sci*; 16:1-5.
- **Lazarowski ER, Schwarzbaum PJ (2009).** Purinergic signals. *Medicina (B Aires)*; 69(2):267-76.
- **Lotan I, Dascal N, Cohen S, Lass Y (1982).** Adenosine-induced slow ionic currents in the *Xenopus* oocyte. *Nature*; 5, 298(5874):572-4.

- **Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ (2002).** Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*; 296(5576):2178-80.
- **O'Malley MA, Mancini JD, Young CL, McCusker EC, Raden D, Robinson AS (2009).** Progress toward heterologous expression of active G-protein-coupled receptors in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking cellular stress response with translocation and trafficking. *Protein Sci* 18 (11):2356-70.
- **Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2011).**  $\beta$ -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*; 32(9):521-33.
- **Manjunath S, Sakhare PM (2010).** Adenosine and adenosine receptors: Newer therapeutic perspective. *Indian Jour Pharmacol*; 41 (3): 97-105.
- **Miledi R, Woodward RM (1989).** Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *J Physiol*; 416:601-21.
- **Montiel M, de la Blanca EP, Jiménez E (2006).** P2Y receptors activate MAPK/ERK through a pathway involving PI3K/PDK1/PKC-zeta in human vein endothelial cells. *Cell Physiol. Biochem.* 18, 123-134.
- **Namba K, Suzuki T, Nakata H (2010).** Immunogold electron microscopic evidence of in situ formation of homo- and heteromeric purinergic adenosine A1 and P2Y2 receptors in rat brain. *BMC Res Notes* 29; 3:323.
- **Nakata H, Yoshioka K, Kamiya T, Tsuga H, Oyanagi K (2005).** Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *Jour Mol Neur* 26(2-3):233-8.
- **Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K (1996).** Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol*; 50(2):224-9.
- **Overton MC, Blumer KJ (2002).** Use of fluorescence resonance energy transfer to analyze oligomerization of G-protein-coupled receptors expressed in yeast. *Methods*; 27(4):324-32.
- **Pfleger KD, Eidne KA (2005).** Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J*; 385(Pt 3):625-37.

- **Ralevic V, Burnstock G (1998).** Receptors for purines and pirimidines. *Pharmacol Rev*, 50(3):413-92.
- **Ramsay D, Kellett E, McVey M, Rees S, Milligan G (2002).** Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem J*; 365(Pt 2):429-40.
- **Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR (2007).** D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 Proc Nat Acad Sci USA in the striatum. 104, 654–659.
- **Reddy PS, Corley RB (1998).** Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *Bioessays*; 20(7):546-54.
- **Robles-Martínez L (2010).** **Dependencia de la respuesta purinérgica del folículo ovárico de *Xenopus laevis* A Ca<sup>2+</sup>.** Tesis de Maestría en Ciencias (Neurobiología). Instituto de Neurobiología, UNAM.
- **Romero VJ (2006).** Análisis Funcional de los Receptores Purinérgicos en el Folículo de *Xenopus*. Tesis de Maestría en Ciencias (Neurobiología). Instituto de Neurobiología, UNAM.
- **Rozenfeld R, Devi LA (2010).** Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*; 31(3):124-30.
- **Saldaña C, Vázquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO (2005).** Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K<sup>+</sup> current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Jour Cell Phys* 2005 Mar;202(3):814-21.
- **Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2011).** β-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*; 32(9):521-33.
- **Sitkovsky MV, Ohta, A (2005).** The 'danger' sensors that STOP the immune response: The A2 adenosine receptors? *Trends Immunol*. 26, 299–304.

- **Susuki Namba K, Tsuga H, Nakata H (2006).** Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A1 adenosine receptor and P2Y2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 15;351(2):559-65.
- **Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M (2003).** Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol*; 17(4):677-91.
- **Umapathy NS, Fan Z, Zemskov EA, Alieva IB, Black SM, Verin AD (2009).** Molecular mechanisms involved in adenosine-induced endothelial cell barrier enhancement. *Vascul Pharmacol* 52 (2010) 199–206.
- **Vázquez-Cuevas FG, Zárate-Díaz EP, Garay E, Arellano RO (2010).** Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 14; 8:88.
- **Von Kugelgen, I. (2006).** Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* 110, 415-432.
- **Webb TE, Henderson DJ, Roberts JA, Barnard EA (1998).** Molecular cloning and characterization of the rat P2Y4 receptor. *J Neurochem*; 71(4):1348-57.
- **Wu J, Steinebrunner I, Sun Y, Butterfield T, Torres J, Arnold D, Gonzalez A, Jacob F, Reichler S, Roux SJ (2007).** Apyrases (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolases) play a key role in growth control in Arabidopsis. *Plant Physiol*;144(2):961-75.
- **Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M, Jones MR, St Hilaire C, Seldin DC, Toselli P, Lamperti E, Schreiber BM, Gavras H, Wagner DD, Ravid K (2006).** The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *Jour Clin Inv*; 116:1913-1923.
- **Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H (2002).** Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A(1) and P2Y(1) receptors in living cells. *FEBS Lett* 17; 523 (1-3):147-51.
- **Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S (2007).** Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* (8):945-53.