



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Identificación de proteínas con afinidad por  
el receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$ .”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

LIZBETH ROCÍO RAMÍREZ VIDAL



Los Reyes Iztacala, Tlalneantla, México

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente estudio se realizó en la Sección Externa de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del Dr. José Vázquez Prado.

Esta tesis se llevó a cabo con el apoyo de una beca del proyecto SEP-2003-43970 "Mecanismos moleculares y fisiológicos de migración polarizada en células endoteliales" financiado por CONACYT.

*A esa gran persona, que ha sido mi guía en el camino de la vida, en quien siempre puedo encontrar el mejor y más desinteresado de los consejos. Tu esfuerzo y dedicación me han permitido superarme personal y profesionalmente.*

*Sólo puedo darte las gracias, a ti que eres el ser más importante de mi mundo. Gracias por enseñarme a ser fuerte y no rendirme.*

*A mi madre con todo cariño y respeto.*

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis abuelos...

Que tanto quiero y admiro, y aunque a distancia, han sabido enseñarme con el ejemplo que con dedicación se consiguen las más grandes metas y que una vida honesta y respetuosa brinda las mayores satisfacciones.

A mis amigos...

Con quienes conviví durante estos años y con quienes comparto tantos recuerdos agradables; les agradezco su apoyo y amistad sobretodo en los momentos difíciles, porque con ustedes aprendí las cosas que no se adquieren de los libros.

Al Dr. José Vázquez Prado y la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, por dirigirme en la realización del presente trabajo, por orientarme y aconsejarme en momentos decisivos.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos de laboratorio del CINVESTAV por haberme apoyado durante mi estancia y haberme brindado su amistad y confianza.

# ÍNDICE

	PÁGINA
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
I. Transducción de señales.....	3
II. Receptores acoplados a proteínas G.....	4
III. Activación de GPCRs y vías de señalización.....	6
IV. Modulación de la función de receptores acoplados a proteínas G.....	8
V. Clasificación de los receptores de siete hélices transmembranales.....	9
<b>Los receptores <math>\alpha_1</math>-adrenérgicos como modelo de GPCRs</b>	
I. Características generales y clasificación de los receptores adrenérgicos....	10
II. Receptores $\alpha_1$ -Adrenérgicos.....	11
III. Características estructurales de los $\alpha_1$ -AR.....	13
IV. Vías de señalización activadas por los receptores adrenérgicos $\alpha_1$ .....	14
<b>Receptores <math>\alpha_{1D}</math> adrenérgicos</b>	
I. Distribución celular de los $\alpha_1$ -AR.....	17
II. Función de la región N-terminal del $\alpha_{1D}$ -AR.....	18
III. Participación de los receptores $\alpha_{1D}$ -AR en procesos fisiológicos.....	20
<b>Antecedentes</b>	
I. Proteínas reguladoras de la función de receptores adrenérgicos.....	21
<b>Hipótesis</b> .....	23
<b>Objetivos</b> .....	24
<b>Material y métodos</b> .....	25
I. Clonación de los dominios N y C-ter del $\alpha_{1D}$ -AR .....	25
II. Pruebas preliminares de la técnica del doble híbrido.....	28
III. Identificación de proteínas con afinidad por los dominios amino y carboxilo del $\alpha_{1D}$ -AR mediante el tamizaje de una librería de cDNAs de corazón.....	31
IV. Confirmación de interacciones.....	32
V. Subclonación de los cDNAs aislados en vectores de expresión para células de mamífero.....	33

VI. Pruebas para determinar la expresión de las clonas en células HEK 293-T.....	33
VII. Clonación del cDNA del receptor $\alpha_{1D}$ -AR completo.....	36
VIII. Efecto de las clonas aisladas sobre la distribución celular del $\alpha_{1D}$ -AR.....	36
IX. Evaluación del efecto de las proteínas, por el sistema del doble híbrido, sobre la función del $\alpha_{1D}$ -AR por la técnica de fosfatos de inositol.....	37
<b>Resultados.....</b>	<b>40</b>
I. Clonación de los dominios N y C-ter del $\alpha_{1D}$ -AR.....	40
II. Pruebas preliminares de la técnica del doble híbrido.....	43
III. Tamizaje entre los dominios N y C-ter del $\alpha_{1D}$ AR con una librería de cDNAs de corazón.....	44
IV. Confirmación de la especificidad de las interacciones “carnada-presa”.....	46
V. Subclonación de los cDNAs correspondientes a las presas y el receptor $\alpha_{1D}$ -AR en vectores de expresión para células de mamífero.....	48
VI. Utilización de la técnica de fosfatos de inositol para evaluar el efecto de las clonas sobre la función del receptor.....	50
<b>Análisis de resultados.....</b>	<b>52</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>56</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>57</b>

## Resumen.

Los receptores  $\alpha_{1D}$  adrenérgicos tienen siete dominios transmembranales y se acoplan a proteínas G heterotriméricas, estos receptores pertenecen a un grupo más general constituido por tres receptores: los  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ , donde los  $\alpha_1$  se subdividen en  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ . Los receptores  $\alpha_{1D}$  adrenérgicos han sido vinculados con procesos patológicos como la hipertensión arterial e hiperplasia prostática benigna. Algunos estudios han permitido atribuir funciones específicas a distintas regiones estructurales de los receptores  $\alpha_1$ , en particular se ha observado que el dominio amino terminal mantiene intracelularmente al receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$ , sugiriendo la interacción con proteínas reguladoras que pudieran modular su expresión y función. En este estudio se utilizaron los dominios amino y carboxilo terminal del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  como carnadas para identificar proteínas con afinidad por estos dominios mediante el tamizaje de una librería de corazón, empleando la técnica del doble híbrido en levadura. Entre las proteínas identificadas podemos mencionar: la proteína asociada a adenilato ciclasa (Bockaert y Pin), nebullette, selenoproteína W, proteínas F-box 7 y 22, prosaposina y AMSH. Los estudios realizados han permitido determinar la participación de algunas de estas proteínas en la función del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR en células Hek 293-T.



## Abstract

The alpha 1D adrenoceptors are seven transmembrane receptors coupled to heterotrimeric G proteins, these receptors have been classified within a most general group which includes: the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ , the  $\alpha_1$ -ARs are subdivided into  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ . The alpha 1D adrenergic receptors have been associated with pathological processes such as hypertension and prostatic benign hyperplasia. Some studies permitted the assignment of distinct function to different structural regions in the  $\alpha_1$  adrenergic receptors; in particular, it has been observed that the amino terminal region of the  $\alpha_{1D}$  adrenergic receptor maintains it in intracellular compartments thus suggesting the interaction with intracellular proteins that could be modulating the expression and function of these receptors. In this study, we used the amino and carboxyl terminal domains of the  $\alpha_{1D}$  adrenergic receptor in order to identify proteins with affinity for these regions using the yeast two hybrid system with a human heart cDNA library. The proteins identified include: the cyclase associated protein (CAP), nebulin, selenoprotein W, F-box proteins 7 and 22, prosaposin and AMSH. Functional assays indicated that some of these proteins affect the sensibility of  $\alpha_{1D}$  adrenergic receptor in HEK 293-T cells.

## Introducción

### I. Transducción de señales

Las células reciben y responden a señales de su ambiente, es decir cambian su actividad para adaptarse al entorno. Organismos tan sencillos como las bacterias y las levaduras son capaces de responder a los cambios en temperatura, luz, estrés osmótico, entre otros; algunos organismos eucariontes unicelulares incluso son capaces de migrar hacia un gradiente de concentración químico. Sin embargo, es en los organismos multicelulares donde la comunicación célula-célula alcanza sus niveles más altos de sofisticación y complejidad. Los organismos unicelulares y multicelulares reciben estímulos externos que pueden ser de naturaleza mecánica, química, luminosa o incluso por el contacto entre células (Cooper, 2004; Pollard, 2004).

Las diferentes moléculas (estímulos) transmiten información entre las células de organismos multicelulares, actuando como ligandos que se unen a receptores específicos (usualmente una proteína de membrana) expresados en células blanco. En una fase inicial, las células reconocen este estímulo mediante su unión a un receptor que al ser activado transduce la señal externa en una señal química (mensajero) interna (Pollard, 2004), donde el mensajero químico actúa sobre un sistema efector para modificar el comportamiento de las células (Fig.1). La transducción de señales es un proceso complejo donde la información pasa a través de vías de señalización que consisten en series de proteínas distintas, donde típicamente una proteína actúa sobre la siguiente cambiando su conformación (Karp, 2002).

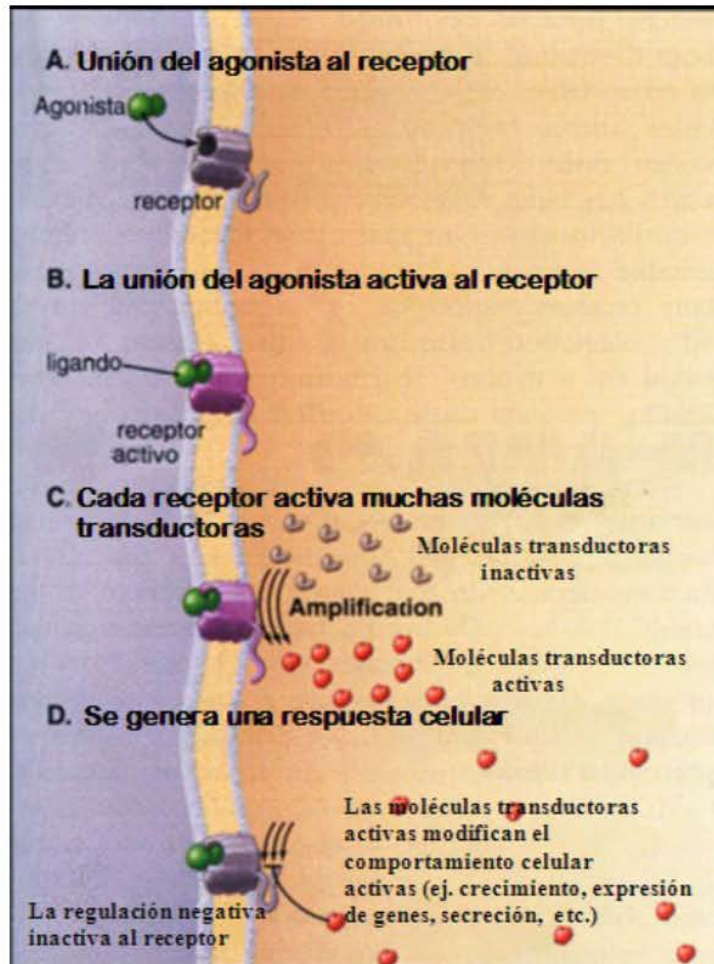


Fig. 1 Activación de receptores y transducción de señales (Pollard, 2004).

Los miles de ligandos conocidos actúan a través de 20 familias de receptores, cada cual asociada a distintos mecanismos de señalización transduccional. Entre las familias de receptores podemos mencionar: los receptores con actividad de cinasa de tirosina, receptores para citocinas, receptores con actividad de fosfatasa de tirosina, canales iónicos activados por ligando, receptores acoplados a proteínas G y receptores con actividad guanilato ciclasa, entre otros (Pollard, 2004).

## II. Receptores acoplados a proteínas G.

### Estructura y función.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) transmiten las señales al interior de la célula a través de proteínas que unen nucleótidos de guanina (GDP en

estado basal o GTP en estado activo), las llamadas proteínas G, estas proteínas están conformadas por tres subunidades designadas como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . A través de este sistema ejercen sus efectos muchos neurotransmisores, hormonas peptídicas, eicosanoides y neuropépidos.

La superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) ha evolucionado como el sistema de señalización transduccional más ampliamente usado en mamíferos (Offermanns, 2003), constituye una de las familias más importantes de receptores de membrana que permiten la comunicación entre las células y con otros organismos. En vertebrados, esta familia puede incluir a más de 2000 receptores y representa aproximadamente el 1% del genoma (Vazquez-Prado *et al.*, 2003). Más de una cuarta parte de los fármacos que actualmente se prescriben actúan como ligandos o ejercen sus efectos a través de esta gran familia de receptores (Karp, 2002).

Los miembros de esta familia comparten una estructura general que consiste en una región amino terminal (N-ter) extracelular, siete dominios transmembranales (TM 1-7) interconectados por tres asas extracelulares y tres intracelulares en disposición alterna y una región carboxilo terminal (C-ter) intracelular (Tanoue *et al.*, 2002b; Vazquez-Prado *et al.*, 2003) (Fig.2).

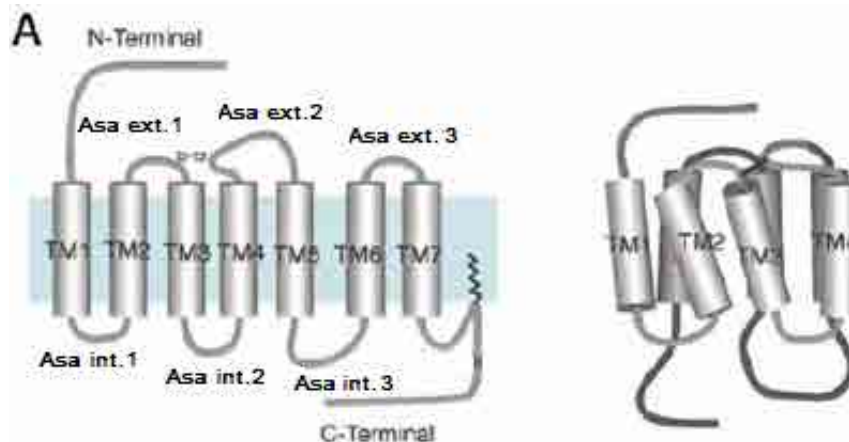


Fig. 2 Representación bidimensional de los GPCRs, imagen del sitio <http://isoft.postech.ac.kr/Research/POSBIOTM/content/struc.html>

Los procesos de señalización, mediados por estos receptores, están involucrados en un gran número de eventos fisiológicos y patológicos, algunos desórdenes congénitos han sido relacionados con defectos en los GPCRs, entre los cuales podemos mencionar la retinitis pigmentosa causada por un defecto en el receptor para rodopsina (Karp, 2002). Entre los procesos mediados por estos receptores se encuentra la percepción de estímulos luminosos y sensoriales, metástasis, neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea y movimiento celular, entre otros (Karp, 2002; Lefkowitz, 2004; Pollard, 2004).

### **III. Activación de GPCRs y vías de señalización.**

Experimentos bioquímicos y de mutagénesis han permitido identificar algunas regiones de particular importancia para la activación de estos receptores, se ha observado que el cambio de orientación entre los dominios transmembranales 3 y 6 es importante en este proceso; por otro lado se sabe que en la segunda y tercera asas intracelular se encuentran los sitios de unión a proteínas G (Bockaert y Pin, 1999).

Los GPCRs, al ser activados por la unión con un ligando químico, incrementan su afinidad por proteínas G heterotriméricas, estableciéndose un complejo entre agonista, receptor y proteína G. Esta interacción causa un cambio conformacional en la subunidad  $\alpha$  del heterotrímico lo cual favorece el intercambio de GDP por GTP y la subsecuente disociación de la subunidad  $\alpha$  del dímero  $\beta\gamma$ , que actúan por separado sobre diferentes moléculas efectoras y promueven la generación de segundos mensajeros, permitiendo de esta manera la transmisión de señales (Karp, 2002; Pollard, 2004).

Esta familia de receptores puede llevar a cabo sus funciones a través de diferentes proteínas G existentes en la naturaleza, algunas de estas pueden tener una función estimuladora o inhibitoria dependiendo de la subunidad  $\alpha$ , entre las

diferentes isoformas tenemos por lo menos 20 subunidades  $G\alpha$  diferentes, cinco  $G\beta$  y 12  $G\gamma$ , existen por lo tanto diferentes combinaciones entre las subunidades de las proteínas G, esto les confiere diferentes capacidades de respuesta al asociarse a un receptor o una proteína efectora, además pueden presentar una distribución diferencial según el tipo celular del que se trate. De esta manera podemos dilucidar que un mismo estímulo puede causar una respuesta diferente en sistemas celulares distintos. Por la similitud en sus secuencias y las funciones que desempeñan, las subunidades  $G\alpha$  se han clasificado en 4 clases principales ( $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12/13}$ ) cada una de ellas puede llevar a la activación de diferentes proteínas efectoras y por lo tanto distintas vías de señalización (Offermanns, 2003).

La activación de la vía de señalización mediada por la familia  $G\alpha_s$  promueve la acumulación de cAMP, por activación de la adenilato ciclasa; al estimular la familia de  $G\alpha_i$  se promueve la inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que  $G\alpha_{q/11}$  activa a la fosfolipasa C $\beta$  (PLC- $\beta$ ) y como consecuencia se libera  $Ca^{2+}$  al citosol. Las señales mediadas por  $G\alpha_{12/13}$  incluyen formación de fibras de estrés, dependientes de la activación de la GTPasa Rho, importantes durante el movimiento celular (Offermanns, 2003).

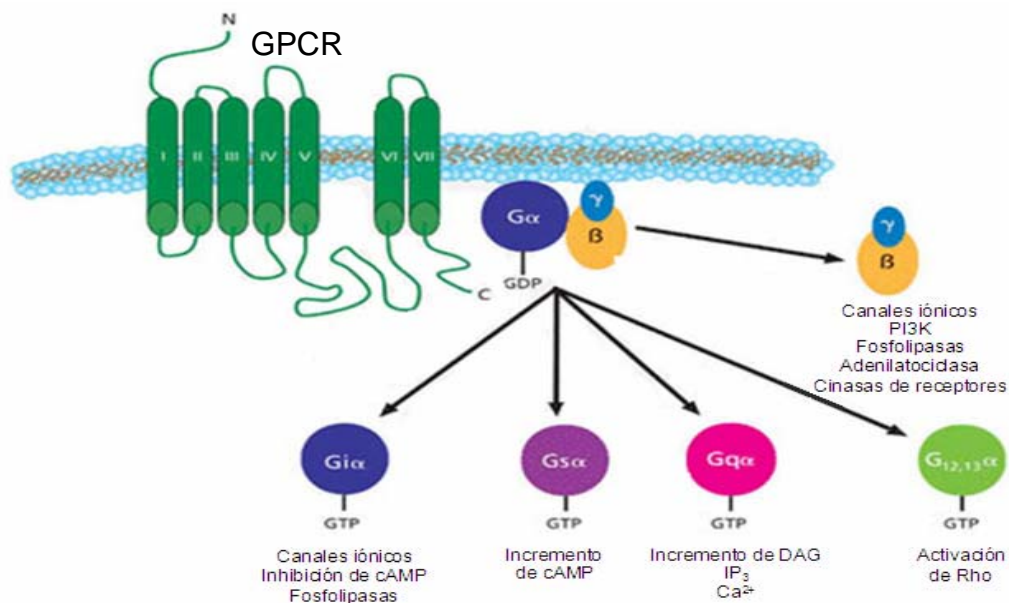


Fig. 3. Principales subfamilias de proteínas G activadas por receptores de siete dominios transmembranales y sus principales efectos.

La evidencia experimental sugiere que los GPCRs presentan un estado de equilibrio entre dos modelos de activación, donde pueden pasar de un estado inactivo a un estado espontáneamente activo que permite la unión del receptor con proteínas G heterotriméricas en ausencia de ligando (Gisbert *et al.*, 2000).

#### IV. Modulación de la función de receptores acoplados a proteínas G:

Usualmente cuando las células están expuestas a algún agonista por un periodo prolongado o a una concentración alta, la respuesta subsecuente a dicho agente disminuye progresivamente o termina en la mayoría de los casos. Este proceso biológico se conoce como desensibilización del sistema o taquifilaxis (García-Sainz *et al.*, 2000), donde un receptor al ser estimulado puede llevar a su propia inactivación (desensibilización homóloga) o bien promover la inactivación de otros receptores (desensibilización heteróloga), en este proceso están involucradas varias proteínas que actúan a través de una serie de pasos para llevar a la regulación de la respuesta. De manera inicial la fosforilación de la región C-terminal de los GPCRs inactiva al receptor incrementando su afinidad por moléculas de arrestina, lo que interfiere estéricamente la unión del receptor con la proteína G, estableciéndose de esta manera el estado de desacoplamiento del receptor. Las  $\beta$ -arrestinas unen moléculas de clatrina, lo cual inicia el proceso de internalización de receptores fosforilados (Fig. 4)(García-Sainz *et al.*, 2000; Vázquez-Prado *et al.*, 2003).

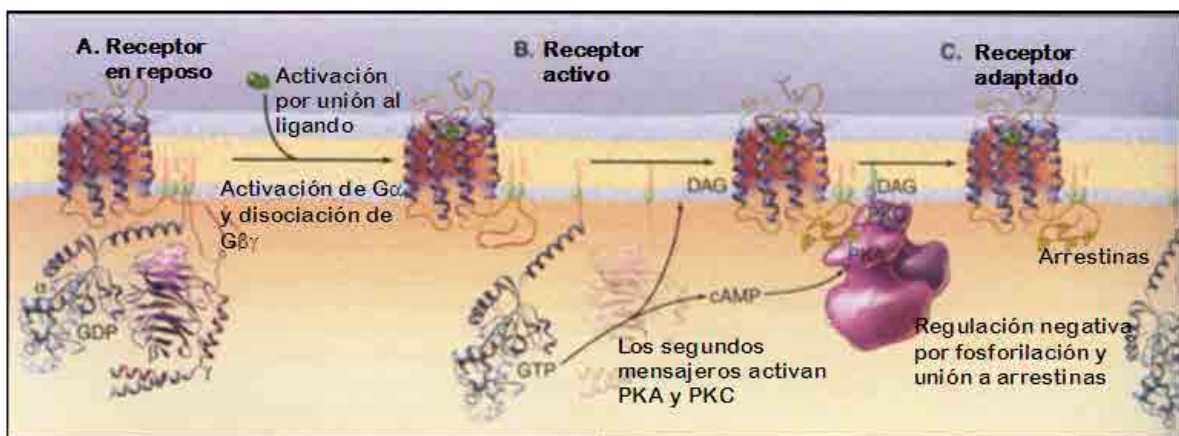


Fig. 4. Desensibilización de receptores acoplados a proteínas G (Pollard, 2004).

En el proceso de desensibilización homóloga participan cinasas, activadas por receptores acoplados a proteínas G, conocidas como GRKs (familia de por lo menos 6 cinasas que fosforilan en residuos de serina/treonina). Durante la desensibilización heteróloga participan cinasas activadas por segundos mensajeros y donde cualquier estímulo que pueda incrementar la concentración de estas moléculas, potencialmente puede inducir fosforilación y desensibilización de cualquier GPCR que presente los sitios consenso para fosforilación por la cinasa en turno (García-Sainz *et al.*, 2000), entre las principales cinasas activadas por segundos mensajeros podemos mencionar a la proteína cinasa A ó PKA (cinasa dependiente de AMPc), la proteína cinasa C, llamada PKC (cinasa activada por diacilglicerol y  $Ca^{2+}$ ) (Cooper, 2004).

#### V. Clasificación de los receptores de siete hélices transmembranales:

La comparación entre las diferentes secuencias de los receptores de siete hélices transmembranales ha permitido el establecimiento de varias familias de GPCRs. Todos estos receptores presentan una región “core” común constituida por siete dominios transmembranales (TM1-TM7), la mayor parte de las diferencias entre estos receptores consisten en la longitud y función de sus regiones amino y carboxilo terminal, así como en las asas intracelulares, cada uno de estos dominios provee propiedades específicas entre las diferentes proteínas receptoras (Offermanns, 2003).

Se han establecido tres familias principales de receptores acoplados a proteínas G (Fig. 5), sus miembros prototipo son el receptor para rodopsina, secretina y receptores metabotrópicos para glutamato respectivamente. Alrededor de la mitad de los receptores de la familia 1 están involucrados en la detección de estímulos luminosos, de sabor u olor (Offermanns, 2003; Foord *et al.*, 2005). En las clasificaciones recientes se reportan 276 genes funcionales que codifican para receptores de la familia 1, 53 para la familia 2 y 19 para la familia 3. También se ha catalogado como un grupo aparte a los llamados receptores “frizzled”, enlistándose 11 miembros dentro de esta clase (Foord *et al.*, 2005).



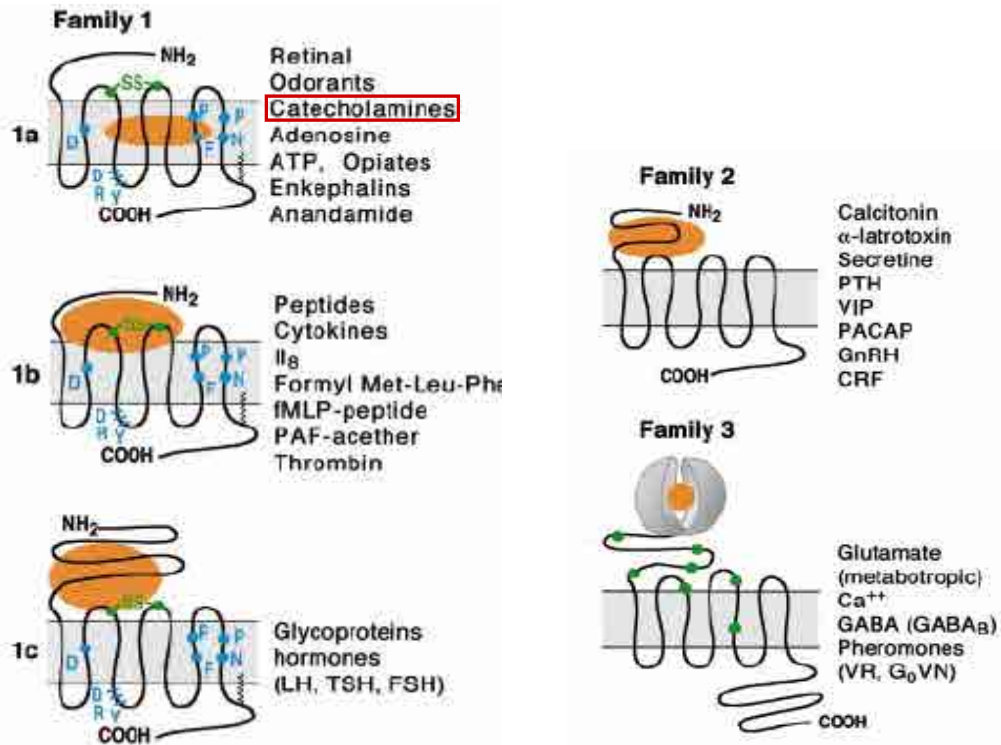


Fig. 5. Clasificación y diversidad de los GPCRs. Principales tres familias (Bockaert y Pin, 1999).

## Los receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos como modelo de GPCRs

### I. Características generales y clasificación de los receptores adrenérgicos.

Entre los principales receptores acoplados a proteínas G tenemos a los receptores adrenérgicos (ARs), pertenecientes a la clase 1, representada por el receptor para rodopsina (Foord *et al.*, 2005; Finch y Graham, 2006). Estos receptores son activados por las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, se encuentran ampliamente distribuidos y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis.

Los receptores adrenérgicos inicialmente fueron clasificados en  $\alpha$  y  $\beta$ , pero estudios moleculares y farmacológicos subsecuentes han permitido la clonación y caracterización de un mayor número de receptores. En la actualidad los receptores adrenérgicos se clasifican en tres familias ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ ), cada una con tres miembros:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  respectivamente (Foord *et al.*, 2005).

Los receptores  $\beta$  adrenérgicos fueron los primeros en ser descritos, este grupo ha sido vinculado con la regulación del sistema nervioso central, cardiovascular, pulmonar (García-Sainz *et al.*, 2000; Mier *et al.*, 2002) y endócrino además de tener una participación importante en vías metabólicas como la lipólisis (Collins *et al.*, 2004; Flordellis *et al.*, 2004) y patologías como insuficiencia cardíaca (Flordellis *et al.*, 2004; Koch, 2004).

Los receptores  $\alpha_2$  se encuentran distribuidos en el sistema nervioso central (SNC), participan en el control presináptico para la liberación de catecolaminas de las terminales adrenérgicas del sistema nervioso simpático y están involucrados en la regulación del tono vascular de la placenta durante el desarrollo prenatal (Brede *et al.*, 2004), son mediadores de la respuesta de hipotensión producida por catecolaminas, así como de la inhibición de la liberación de insulina y participan durante procesos de agregación plaquetaria (Flordellis *et al.*, 2004).

Los receptores  $\alpha_1$ , se encuentran distribuidos en la corteza cerebral, el hipocampo, músculo liso vascular de arterias como la aorta, mesentérica superior de resistencia (Schwinn *et al.*, 1990; Piascik y Perez, 2001), carótida (Villalobos-Molina *et al.*, 1999) y femoral (Hrometz *et al.*, 1999). Desempeñan funciones importantes como la neurotransmisión simpática, la modulación del metabolismo hepático, la contracción uterina, la regulación del metabolismo de líquidos y electrolitos, modulan el tono vascular y la contracción del músculo liso en el sistema genitourinario (García-Sainz *et al.*, 2000).

## **II. Receptores $\alpha_1$ -Adrenérgicos:**

Este grupo de receptores ha sido vinculado con la regulación de la contracción del músculo liso vascular. Aunque se ha propuesto que este tejido presenta una expresión heterogénea de  $\alpha_1$ -adrenoreceptores, ha sido posible observar que un solo subtipo de receptor es responsable en la mediación de la contracción del músculo liso

vascular. El receptor adrenérgico  $\alpha_{1A}$  es mediador de la contracción en arteria renal y caudal (Hrometz *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2000; Piascik y Perez, 2001), mientras que el  $\alpha_{1D}$ -AR regula este proceso en la aorta (Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2000; Tanoue *et al.*, 2002b; Gisbert *et al.*, 2003), y las arterias mesentérica superior, femoral e iliaca (Hrometz *et al.*, 1999; Piascik y Perez, 2001; Ziani *et al.*, 2002). Se ha observado que el  $\alpha_{1B}$ -AR, a pesar de su amplia distribución en vasos sanguíneos, parece no ser mediador de la contracción (Tanoue *et al.*, 2002b; Turnbull *et al.*, 2003).

Los receptores  $\alpha_1$  fueron descritos de manera inicial por sus propiedades farmacológicas, que permitieron la caracterización de 2 subgrupos (Piascik y Perez, 2001),  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ , con afinidades específicas por ciertos agonistas y antagonistas; el  $\alpha_{1A}$  fue definido por presentar mayor afinidad por agonistas como la methoxamina, oximetazolina, fenilefrina y por antagonistas como el 5-metilurapidil, la (+)niguldipina, el WB4101 y la fentolamina (Schwinn *et al.*, 1990; Piascik y Perez, 2001; Gisbert *et al.*, 2003). Además el agente alquilante cloroetilclonidina (CEC) inactiva irreversiblemente al  $\alpha_{1B}$  mientras el  $\alpha_{1A}$  es insensible (Piascik *et al.*, 1994). Debido a la falta de agonistas y antagonistas con suficiente selectividad por los diferentes subtipos, la correlación entre receptores clonados y los farmacológicamente definidos en diferentes tejidos se volvió muy complicada. El  $\alpha_{1B}$ -AR de hámster fue el primero en ser clonado, que presentaba las propiedades farmacológicas definidas, por lo cual su clasificación no fue cuestionada (Piascik y Perez, 2001). Posteriormente se clonó un receptor que fue llamado  $\alpha_{1C}$ -AR y que aparentemente representaba un nuevo subtipo (Schwinn *et al.*, 1990); sin embargo, más tarde fue reclasificado como el  $\alpha_{1A}$ -AR, esta confusión se presentó al no poder localizar el mRNA del receptor en los tejidos donde típicamente se expresa el  $\alpha_{1A}$ -AR (Piascik y Perez, 2001). El siguiente cDNA clonado fue nombrado  $\alpha_{1A}$ -AR (Lomasney *et al.*, 1991; Piascik y Perez, 2001; Garcia-Sainz y Villalobos-Molina, 2004), posteriormente se demostró que correspondía a un nuevo receptor no definido previamente en los estudios farmacológicos, este receptor ahora es conocido como el  $\alpha_{1D}$ -AR (Perez *et al.*, 1991).

La confusión generada nos llevó a la nomenclatura, que se maneja en la actualidad, que comprende 3  $\alpha_1$ -AR:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  (Garcia-Sainz *et al.*, 2000).

### III. Características estructurales de los $\alpha_1$ -AR:

Estos receptores, presentan 7 regiones transmembranales con 20-28 residuos de aminoácidos hidrofóbicos cada una. En su región N-terminal presentan sitios consenso para N-glicosilación y la región C-terminal contiene sitios para fosforilación por GRKs y PKC (Fig. 6), mientras que la segunda y tercer asa intracelular están involucradas con la unión de proteínas G y en el caso de la tercera asa también presenta sitios consenso para fosforilación por PKA (Garcia-Sainz *et al.*, 1999).

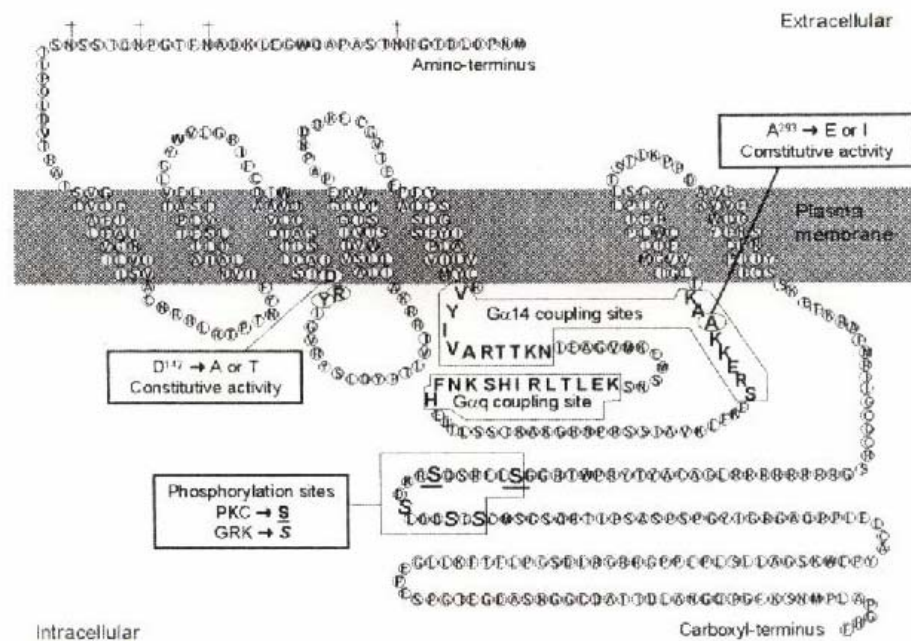


Fig. 6 Modelo esquemático del receptor adrenergico  $\alpha_{1B}$  de hamster (Garcia-Sainz *et al.*, 1999).

La unión de agonistas con estos receptores se da por la presencia de residuos de aminoácidos conservados entre los dominios transmembranales 3 a 7. En la región transmembranal 3 se trata de un residuo de aspartato, en el dominio transmembranal 5 se conservan 2 residuos de serina y en el transmembranal 6 se conserva un residuo de fenilalanina que interactúan con ciertos grupos funcionales

presentes en las catecolaminas (Piascik y Perez, 2001), permitiendo la unión ligando-receptor y la activación del último. La variación en estos residuos entre los diferentes subtipos de  $\alpha_1$ -ARs es la que confiere la especificidad o la afinidad con la que se une un ligando a los diferentes receptores.

A nivel estructural, los  $\alpha_1$ -AR se encuentran altamente conservados incluso entre las diferentes especies, comparten del 70.5 al 71.3% de similitud en las secuencias de sus regiones transmembranales (Finch y Graham, 2006). También se presenta una alta conservación entre las regiones de la tercera asa intracelular de los diferentes  $\alpha_1$ -AR (Hague *et al.*, 2004a), sitio de unión y activación de proteínas Gq/11. Sin embargo el receptor  $\alpha_{1D}$ -AR, de 572 aminoácidos (Garcia-Sainz y Villalobos-Molina, 2004) (13, 42), difiere de los otros dos subtipos en que presenta una región amino terminal inusualmente larga siendo ésta de 97aa, mientras que para el  $\alpha_{1A}$ -AR es de 27aa y de 47aa en el  $\alpha_{1B}$ -AR ([www.hprd.org](http://www.hprd.org)). En la región carboxilo terminal también se observa un grado de similitud menor, estableciéndose de esta manera diferencias en la regulación de la función de estos receptores. Se sabe, por ejemplo, que los sitios consenso para fosforilación por PKA no están presentes en el receptor  $\alpha_{1D}$ -AR en comparación con los otros 2 subtipos.

#### **IV. Vías de señalización activadas por los receptores adrenérgicos $\alpha_1$ .**

Los receptores  $\alpha_1$ -AR llevan a cabo muchas de sus funciones al activar la vía de señalización regulada por proteínas de la familia  $G_{\alpha q/11}$ , utilizando como segundo mensajero un derivado del fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato ( $PIP_2$ ). Este lípido de membrana es sometido a hidrólisis, por la fosfolipasa C (PLC), obteniéndose como productos el diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato ( $IP_3$ ). Estos segundos mensajeros actúan a su vez sobre otras proteínas. El DAG lleva a la activación de la proteína cinasa C (PKC) mientras el  $IP_3$  se une a sus receptores en el retículo endoplasmico, favoreciendo la movilización de calcio al citosol (Hu *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004) (Fig. 7). Existe evidencia de que esta vía de señalización

esta involucrada en el desarrollo de hipertrofia en corazones adultos sometidos a estrés mecánico (Lefkowitz, 2004). También se sabe que estos receptores pueden llevar a la activación de la fosfolipasa D (PLD), sin embargo esto parece ser de manera secundaria a la vía de señalización inicial (Garcia-Sainz *et al.*, 2000), la PLD parece activarse posterior a la estimulación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$ , pero no al estimular los  $\alpha_{1B}$  (McGraw y Liggett, 2005). La activación de la fosfolipasa  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) también parece estar mediada por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Piascik *et al.*, 1994).

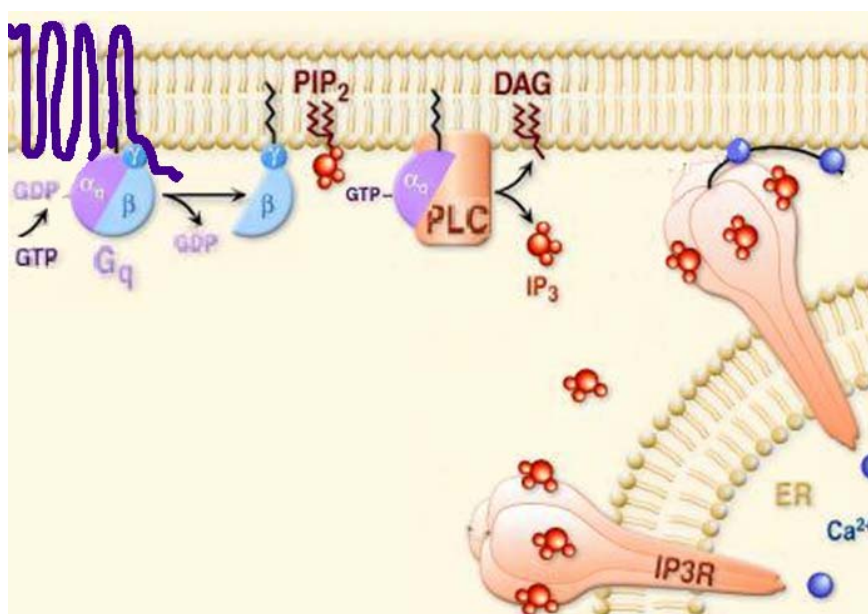


Fig. 7. Vía de señalización activada por proteínas G<sub>q/11</sub>

Algunos estudios permitieron determinar que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos muestran diferencias en la efectividad con la que activan la vía de señalización fosfoinositidos/calcio (descrita anteriormente). Se ha observado que los receptores  $\alpha_{1A}$  presentan la mayor eficiencia de acoplamiento a esta vía de señalización, el  $\alpha_{1B}$ -AR presenta una eficiencia media y el  $\alpha_{1D}$ -AR presenta la menor eficiencia entre los tres receptores (Vazquez-Prado y Garcia-Sainz, 1996; Garcia-Sainz *et al.*, 2000).

Estos receptores pueden ser considerados como protooncogenes, ya que son reguladores del crecimiento celular, además han sido asociados con la activación de la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, familia

de cinasas que fosforila numerosos factores de transcripción) que potencialmente contribuyen con el incremento en la síntesis de DNA y la proliferación de células de músculo liso vascular (Schwinn *et al.*, 1990; Garcia-Sainz *et al.*, 1999). Sin embargo, se presentan diferencias de acoplamiento entre los  $\alpha_1$ -ARs para activar a esta vía, el  $\alpha_{1A}$ -AR activa tres miembros de la familia de MAPK (ERK, JNK y p38), el  $\alpha_{1B}$ -AR media la activación de ERK y p38, mientras que el  $\alpha_{1D}$ -AR sólo activa a ERK (Tanoue *et al.*, 2002b).

En cuanto a la modulación de la función de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, se ha observado que las GRKs 2 y 3 participan en la desensibilización del receptor  $\alpha_{1B}$ -AR (Garcia-Sainz *et al.*, 1999) y que la activación de la PKC bloquea las acciones adrenérgicas mediadas por el receptor  $\alpha_{1D}$ -AR en líneas celulares de fibroblastos Rat-1 establemente transfectadas, mientras que el receptor  $\alpha_{1B}$ -AR se ve medianamente afectado y el  $\alpha_{1A}$ -AR sólo se muestra marginalmente sensible a la activación de la PKC (Garcia-Sainz *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha demostrado recientemente que la internalización de receptores de la familia 1, donde se encuentran los adrenoreceptores, es mediada por el reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas tipo 2 que promueven la unión de clatras y la subsecuente internalización, pero también la coexpresión del receptor con una dominante negativa de la  $\beta$ -arrestina 1 provocó una disminución en la internalización de los receptores  $\alpha_{1B}$ -AR y  $\alpha_{1A}$ -AR, sin embargo no se observó efecto sobre el  $\alpha_{1D}$ -AR (Chalothorn *et al.*, 2003).

De los tres receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, los  $\alpha_{1D}$ -ARs son los menos estudiados debido a que presentan una menor eficiencia de acoplamiento para activar la vía de señalización fosfoinosítidos/calcio (Garcia-Sainz *et al.*, 1999) y a su baja expresión en la membrana celular (Chalothorn *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos estudios han permitido determinar el papel fundamental que desempeñan estos receptores en patologías como la hipertensión (Villalobos-Molina *et al.*, 1999).

## Receptores $\alpha_{1D}$ adrenérgicos.

### I. Distribución celular de los $\alpha_1$ -AR.

Algunos estudios realizados por Chalothorn en el 2002 permitieron observar una distribución celular diferencial de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos al ser transfectados en células HEK 293, donde el  $\alpha_{1B}$ -AR/GFP (fusionado a proteína verde fluorescente, GFP) mostró una fluorescencia ubicada predominantemente en el margen de la célula, en el caso del  $\alpha_{1D}$ -AR/GFP la fluorescencia se detectó principalmente en la región perinuclear y el  $\alpha_{1A}$ -AR/GFP se detectó tanto en la superficie celular como en la región perinuclear (Fig. 8) (Chalothorn *et al.*, 2002).

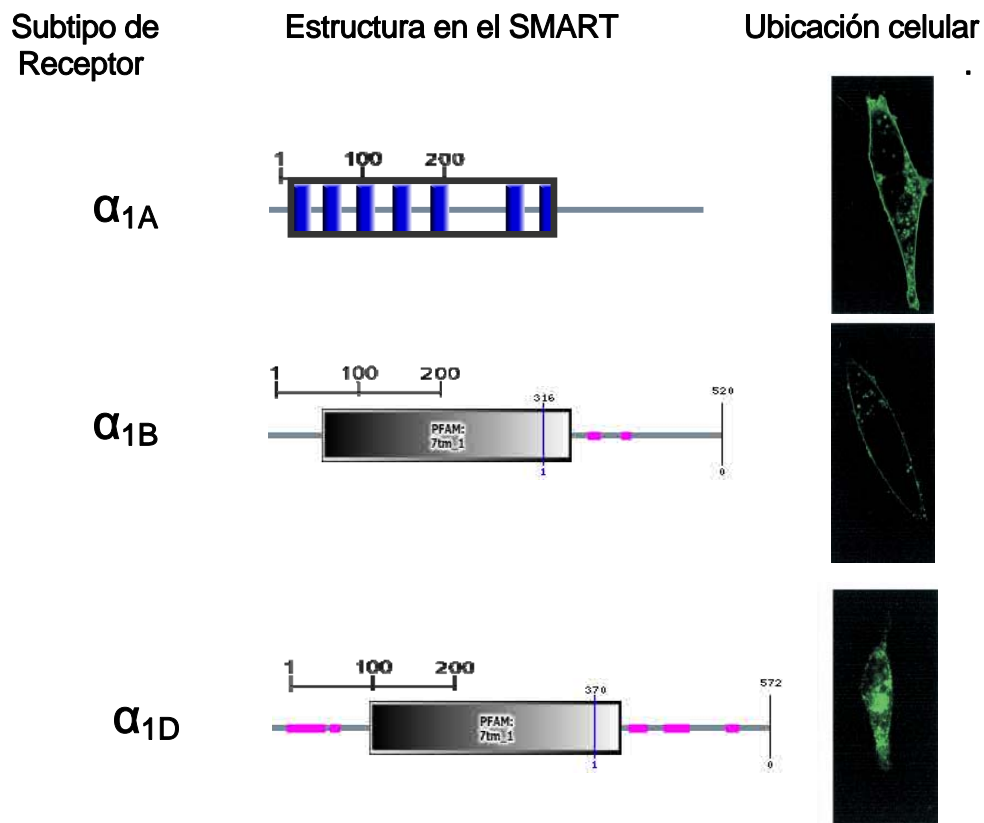


Fig.8. Diferencias de estructura y distribución celular de los  $\alpha_1$ -AR. Estructura proteica, de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  obtenida mediante el análisis de secuencia de aminoácidos empleando el programa SMART, distribución celular de los diferentes  $\alpha_1$ -AR. Imágenes de la derecha tomadas del artículo publicado por Chalothorn *et al.*, 2002.



La expresión a nivel membranar de los diferentes receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ( $\alpha_{1A} > \alpha_{1B} > \alpha_{1D}$ ) correlaciona con la eficiencia de acoplamiento que presentan estos receptores en células transfectadas, pero no predice la respuesta *in vivo* (Hague *et al.*, 2004b).

Recientemente se reportó que los receptores  $\alpha_{1D}$ -AR se encuentran constitutivamente activos (Gisbert *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2003; Garcia-Sainz y Villalobos-Molina, 2004; Zhang *et al.*, 2004) y que algunos antagonistas tradicionalmente usados, como la prazosina, el BMY 7378 y el benoxathian actúan en realidad como agonistas inversos (Garcia-Sainz y Villalobos-Molina, 2004), se ha sugerido que la actividad intrínseca de estos receptores puede ser la causa de su distribución intracelular.

## II. Función de la región N-terminal del $\alpha_{1D}$ -AR.

La localización de los  $\alpha_{1D}$ -ARs en la región perinuclear, así como las diferencias estructurales que presenta este receptor en la región N-terminal con respecto a los otros dos  $\alpha_1$ -ARs, llevaron a la realización de estudios dirigidos a determinar la función de este dominio del  $\alpha_{1D}$ -AR al evaluar la expresión del receptor deletado en los primeros 79 aminoácidos de la región amino terminal ( $\Delta^{1-79} \alpha_{1D}$ ). Ensayos de fotoafinidad y fluorescencia mostraron que el receptor sin este dominio presenta una mayor localización en la superficie de células HEK 293 (Pupo *et al.*, 2003; Hague *et al.*, 2004a) y esta delección además incrementa la formación de fosfatos de inositol en respuesta a norepinefrina (NE) (Fig. 9). Hague *et al.* también mostraron que la región N-terminal del receptor contiene una señal que controla su localización celular, esta señal es transplantable pues al construir  $\alpha_{1A}$  o  $\alpha_{1B}$ -ARs quiméricos en los que se sustituyó su región N-terminal por la del  $\alpha_{1D}$ -AR, se observó que presentaban una localización celular similar a la del  $\alpha_{1D}$ -AR completo (distribución citoplasmática) y que por el contrario, al construir receptores  $\alpha_{1D}$

quiméricos con la región N-terminal sustituida por la del  $\alpha_{1A}$  o  $\alpha_{1B}$ , el receptor quimérico exhibía una localización en membrana celular.

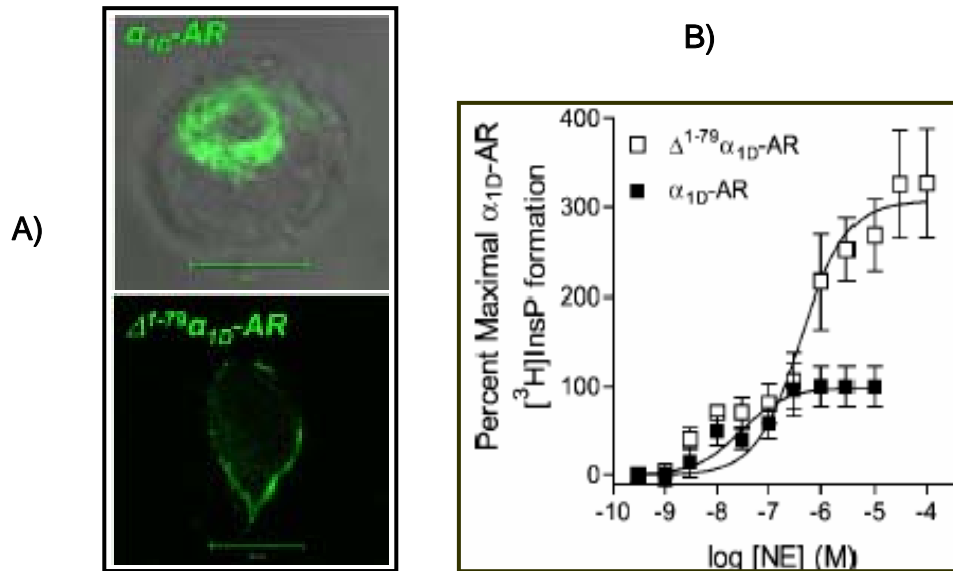


Fig. 9. Diferencias en expresión y función del  $\alpha_{1D}$ -AR silvestre y  $\Delta^{1-79}\alpha_{1D}$ . A) Microscopia confocal del receptor  $\alpha_{1D}$  silvestre y deletado. B) Acumulación de fosfatos de inositol al estimular con NE.

Posteriormente se reportó la heterodimerización entre receptores  $\alpha_1$ -AR en células HEK 293. Por técnicas de coimmunoprecipitación y microscopia confocal fue posible detectar heterodimerización específica, donde los receptores  $\alpha_{1B}$  pudieron interactuar con los  $\alpha_{1A}$  o  $\alpha_{1D}$ -AR, sin embargo no se detectó interacción entre  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$ . Esta interacción no afecta las propiedades de unión a ligandos; por el contrario, la formación de heterodímeros resultó en un incremento mayor a 6 veces en los niveles de expresión del receptor  $\alpha_{1D}$ . La heterodimerización del  $\alpha_{1D}$ -AR con un  $\alpha_{1B}$ -AR deletado (receptor que no se acopla a Gq/11) incrementó la respuesta de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol en comparación con la respuesta evocada por el receptor  $\alpha_{1D}$  adrenérgico solo (Hague *et al.*, 2004b).

### III. Participación de los receptores $\alpha_{1D}$ -AR en procesos fisiológicos.

La eficiencia clínica de los antagonistas  $\alpha_1$ -AR como antihipertensivos refleja la importancia fisiológica de estos receptores en la función vascular y en el mantenimiento de la presión arterial (Tanoue *et al.*, 2002a). Los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos son reguladores del tono vascular periférico *in vivo*, este fenómeno parece estar determinado por la edad (Villalobos-Molina *et al.*, 1999).

En estudios con ratones knockout (ratones con una mutación en el gen del receptor para evitar la expresión del mismo) para el receptor  $\alpha_{1D}$ -AR ( $\alpha_{1D}^{-/-}$ ) se observó que la presión sistólica y la presión arterial fueron significativamente menores al ser comparados con los ratones silvestres. Al medir la respuesta de vasoconstricción a sustancias vasoactivas en ratones no anestesiados, el incremento en la presión arterial y la respuesta de contracción en la aorta fue considerablemente menor en los ratones knockout para el  $\alpha_{1D}$ -AR (Tanoue *et al.*, 2002b). También se ha observado que los ratones knockout para este receptor no desarrollan hipertensión inducida por carga salina (Tanoue *et al.*, 2002a). En corazones de ratones doble knockout para los receptores  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ -AR (ABKO), se observa una respuesta inotrópica negativa posterior al estímulo con fenilefrina y esta respuesta es inhibida por el antagonista selectivo para  $\alpha_{1D}$ -AR, BMY 7378. Se observó que este efecto no es mediado por receptores adrenérgicos presentes en los cardiomiocitos, sino que parece estar regulado por la disminución del flujo coronario. El flujo coronario en ratones silvestres, así como en los ABKO presenta una disminución en aproximadamente el 85% del control (sin estimular, flujo basal) al ser estimulado con fenilefrina y esta disminución se ve abatida por la presencia del antagonista  $\alpha_1$ -AR así como por el BMY 7378 (Turnbull *et al.*, 2003).

Los receptores  $\alpha_{1D}$ -AR contribuyen a la regulación de la contracción no sólo en la vasculatura de conductancia (como la aorta), también participan en la contracción de vasos sanguíneos de resistencia, los cuales son responsables de la reactividad vascular (Tanoue *et al.*, 2002b), como ya se ha mencionado, son mediadores de la

respuesta de vasoconstricción a catecolaminas en arteria mesentérica superior de resistencia, femoral e iliaca.

En algunos estudios funcionales realizados en ratas normotensas o hipertensas, jóvenes y adultas, se observó que la fenilefrina evoca un efecto de presión máxima más elevado en ratas jóvenes y adultas espontáneamente hipertensas (SHR) en comparación con ratas normotensas. El antagonista selectivo para  $\alpha_{1D}$ -ARs (BMY 7378) disminuye ligeramente el efecto evocado por fenilefrina en ratas wistar jóvenes, pero modifica significativamente el efecto del agonista sobre la presión diastólica de ratas jóvenes SHR. En contraste, el BMY 7378 disminuye de manera importante el efecto de presión máxima en ratas adultas normotensas e hipertensas. Estos estudios demuestran la presencia de receptores  $\alpha_{1D}$ -AR en la vasculatura de ratas jóvenes prehipertensas y el factor relacionado con la edad en la aparición de la respuesta de presión sanguínea mediada por estos receptores en ratas adultas normotensas (Villalobos-Molina *et al.*, 1999). Se ha sugerido entonces que el receptor  $\alpha_{1D}$ -AR desempeña un papel fundamental en la elevación de la presión arterial producida por engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos en procesos de hipertensión arterial y con desarrollo y mantenimiento de la misma. De manera particular estos receptores podrían estar relacionados con la respuesta de hiperreactividad vascular característica en el proceso de hipertensión arterial y con el mantenimiento de la contracción (Gisbert *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2003).

## Antecedentes

### IV. Proteínas reguladoras de la función de receptores adrenérgicos.

La importancia funcional del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR así como las diferencias estructurales que presenta con respecto a los otros dos subtipos llevaron a la realización de trabajos enfocados a buscar proteínas que al interaccionar con este receptor, en alguno de sus dominios, pudieran entonces modular su función. Zhang *et al.* en el 2004 utilizaron el sistema del doble híbrido en levadura para identificar proteínas, codificadas a partir de una librería de cDNAs de cerebro humano, que se unieran a la región C-terminal de los receptores  $\alpha_1$ -ARs, se reportó la interacción de la región C-ter del receptor  $\alpha_{1A}$ -AR con la proteína 1 morfogenética de hueso (BMP-1), la proteína relacionada a Bcr activo (Abr) y con la filamina C, además se pudo observar que esta última interacciona con los tres  $\alpha_1$ -ARs (Zhang *et al.*, 2004).

El grupo de Lefkowitz en el 2003 reportó la interacción de una proteína denominada GIPC, aislada a partir de una librería de cDNAs de corazón, con la región C-terminal del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico, esta interacción regula la activación de ERK mediada por este receptor en respuesta a la unión con agonistas (Hu *et al.*, 2003). Posteriormente se aisló de una librería de cDNAs de cerebro humano a la subunidad  $\mu_2$  del complejo adaptador a clatrina 2, dicha proteína fue aislada por su interacción con la región C-terminal del receptor  $\alpha_{1B}$ -AR. La interacción de esta subunidad  $\mu_2$  con el receptor se da a través de un motivo de poliargininas presente en el receptor  $\alpha_{1B}$ -AR y esta interacción desempeña un papel importante en la internalización dependiente de agonista en este receptor adrenérgico (Diviani *et al.*, 2003).

Considerando la importancia funcional del receptor  $\alpha_{1D}$  adrenérgico en la regulación del tono vascular, su participación en procesos patológicos como la hipertensión arterial, así como la actividad de receptores mutantes que sugieren una posible interacción con proteínas reguladoras, resulta importante indagar el mecanismo molecular por medio del cual se regula el funcionamiento del receptor

adrenérgico  $\alpha_{1D}$  a través de sus dominios N y C-terminal, mediante las interacciones que pudieran establecer estos últimos con diferentes proteínas.

## Hipótesis:

Los dominios amino y carboxilo terminales del receptor alfa 1D adrenérgico ( $\alpha_{1D}$ -AR) determinan la distribución de estos receptores en la superficie celular regulando su función; estos antecedentes sugieren que proteínas con afinidad por estas regiones pudieran tener un efecto directo en la localización celular y la sensibilidad de estos receptores para ser estimulados por su ligando.

Para realizar este trabajo y validar la hipótesis se diseñó la siguiente estrategia:

- Identificar proteínas con afinidad por los dominios amino y carboxilo terminales del  $\alpha_{1D}$ -AR, a partir de una librería de cDNAs de corazón.
- Elegir las clonas cuyas secuencias de cDNA resulten de interés según el análisis en bases de datos.
- Analizar la función y localización del  $\alpha_{1D}$ -AR al ser expresado conjuntamente con las clonas de interés.

## Objetivos:

- Objetivo general:

Identificar proteínas afines a las regiones amino y carboxilo terminal del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR.

- Objetivos particulares:

a) Clonar el cDNA correspondiente a las regiones amino y carboxilo terminales del receptor  $\alpha_{1D}$  adrenérgico humano.

b) Determinar la factibilidad de usar los dominios amino y carboxilo terminales del  $\alpha_{1D}$ AR como carnadas en el sistema doble híbrido en levadura.

c) Aislar clonas de cDNA que codifiquen para proteínas con afinidad por los dominios N y C-ter del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$ .

d) Evaluar el efecto de la interacción del receptor con alguna de las proteínas identificadas, en células de mamífero.



## Material y métodos:

### I. Clonación de los dominios N y C-ter del $\alpha_{1D}$ -AR.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  fueron consultadas, para definir y analizar las regiones a estudiar, en la base de datos de nucleótidos del sitio de internet de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), la búsqueda se realizó por "alpha 1D adrenergic receptor". Para todos los análisis posteriores se utilizó la secuencia del  $\alpha_{1D}$ -AR humano con número de identificación NM\_000678. La información de las secuencias aminoacídicas y de cDNAs consultadas fueron guardadas en el programa BioEdit (Biological System Alignment Editor).

El análisis de secuencias de aminoácidos se realizó con el programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool), disponible públicamente en el sitio de internet <http://smart.embl-heidelberg.de/>. El programa permitió definir mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos del receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico, los límites de los diferentes dominios presentes en el receptor.

Una vez definida la secuencia de cDNA correspondiente a los dominios N y C-terminales del  $\alpha_{1D}$ -AR, se determinaron las secuencias de los oligonucleótidos 5' y 3', cuyo diseño incluyó la incorporación de los sitios de corte para enzimas de restricción NheI y EcoRI, que posteriormente permitieron la subclonación de estos fragmentos del receptor en diferentes vectores.

Los dominios amino y carboxilo terminales fueron amplificados por separado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se llevó a cabo en un termociclador modelo Gene Amp PCR Sistem 9600 de la marca Perkin Elmer. La reacción se llevó a cabo por 30 ciclos: 1' a 95° C, 1' a 60° C, 2' a 72° C; con un ciclo inicial de 5' a 95° C y un ciclo final de 7' a 12° C.

Para la reacción se utilizaron los pares de oligonucleótidos 5' y 3' (para el extremo amino terminal ATAGCTAGCATGACTTTCCGCGATCTCCTGAGCG y ATAGAATTCTCAGCCCACGCCCTGCGCGCTCACC, para el extremo carboxilo

terminal ATAGCTAGCAGCCGCGAGTTCAAGCGCGCC y  
ATAGAATTCTTAAATATCGGTCTCCCGTAGGTTGC), el cDNA del  $\alpha_{1D}$ -AR como  
templado (donado por el Dr. Jesús Adolfo García Sáinz del Instituto de Fisiología  
Celular, UNAM), la reacción se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit  
utilizado, según se indica a continuación.

Debido a la presencia, en la región 5' correspondiente al dominio amino  
terminal, de regiones ricas en GC (nucleótidos de guanina y citosina que forman  
estructuras secundarias impidiendo la polimerización correcta del fragmento de  
DNA), se utilizó el sistema Advantage 2 GC de CLONTECH para la amplificación  
de este fragmento de DNA. La región carboxilo terminal se amplificó utilizando el  
sistema de ROCHE Ampli Taq Gold.

Posteriormente se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (agarosa  
ultra pura de Gibco Brl) al 1.5% (solución p/v, en Tris-acetate-EDTA 1X "TAE 1X")  
los fragmentos de DNA de la región N y C-terminales amplificados por PCR, para  
confirmar por comparación con el marcador de referencia de 1000 pb, el tamaño  
definido en el análisis informático de la secuencia (dominio N-ter 294 pb y dominio  
C-ter 503 pb), en cuyo caso los productos de PCR fueron purificados (empleando  
el kit QIAquick PCR purification de QIAGEN) y digeridos con enzimas de  
restricción correspondientes a los sitios de corte NheI y EcoRI (ROCHE),  
previamente incluidos en los oligonucleótidos. La electroforesis se llevó a 70mA  
por aproximadamente 25min, los geles fueron observados y fotografiados a 365  
nm en un transiluminador modelo Bio Doc-It Imaging Sistem LM-20E de la marca  
UVP.

El vector pGB3 (construido por el Dr. Vázquez sustituyendo el sitio de  
multiclonación del vector pGBKT7 de Clontech por el del vector pCEFL EGFP, del  
laboratorio del Dr. Silvio Gutkind en el NIH, del sitio Nde I al Not I, Fig. 10),  
previamente digerido con las enzimas de restricción NheI -EcoRI (ROCHE) y  
purificado del gel de azarosa, se ligó con los fragmentos N o C-ter del receptor  
 $\alpha_{1D}$ -adrenérgico para obtener los plásmidos correspondientes, pGB3 N-ter  $\alpha_{1D}$ AR  
y pGB3 C-ter  $\alpha_{1D}$ -AR. La reacción de ligación ocurrió en un termociclador a 16° C

toda la noche, siguiendo las especificaciones descritas para la enzima ligasa T4 de Roche. El análisis electroforético en gel de agarosa se utilizó para verificar la ligación de los dominios de interés en el vector pGB3.

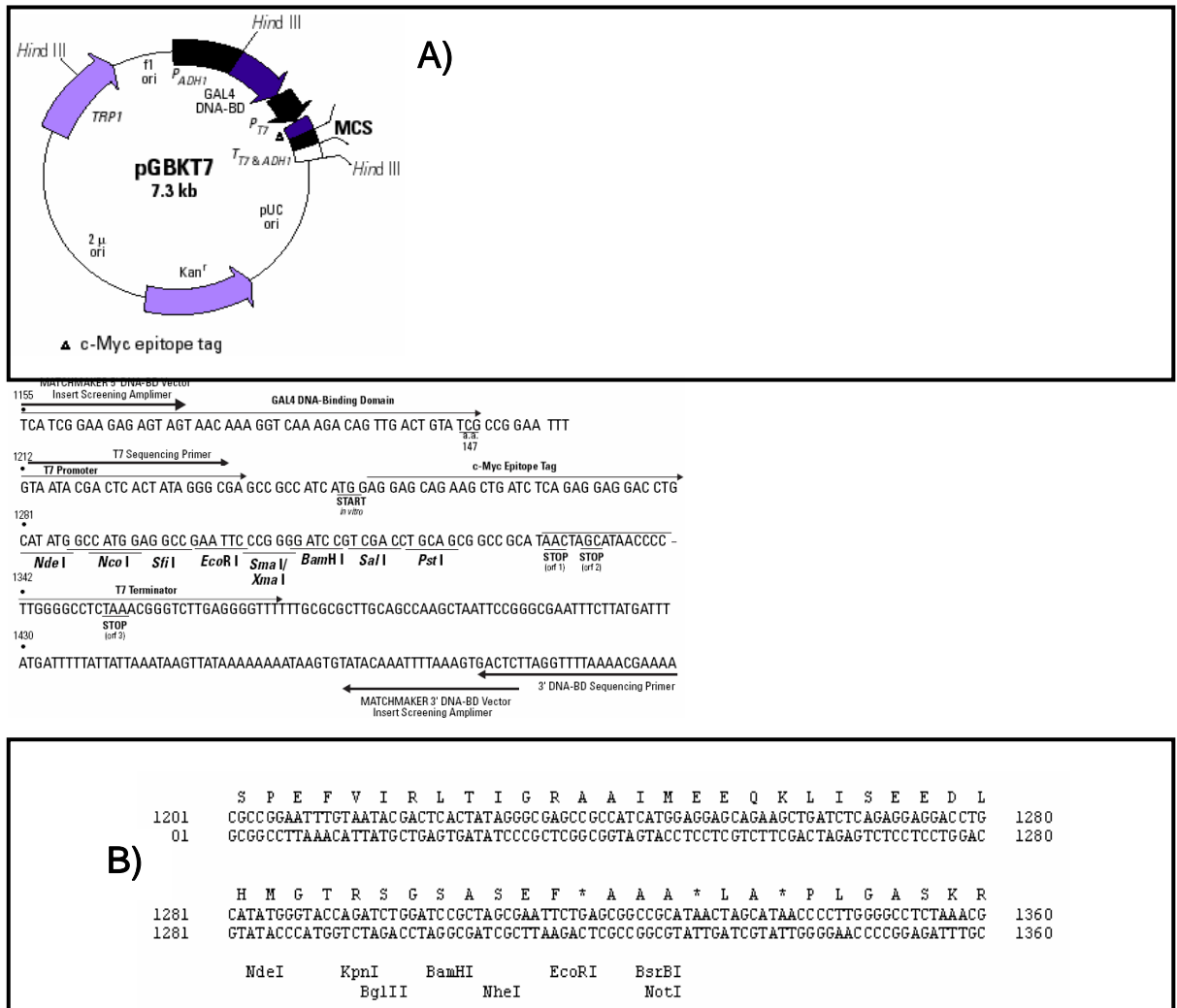


Fig 10. Construcción del vector pGB3. A) Vector pGBKT7 y su sitio de multiclonación y B) Sitio de multiclonación del vector pGB3.

Una vez verificado el tamaño de los insertos, los plásmidos pGB3 N-ter  $\alpha_{1D}$ AR y pGB3 C-ter  $\alpha_{1D}$ -AR fueron usados para transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  (competentes por el método de CaCl<sub>2</sub> descrito por Morton Mandel y Akiko Higa en 1970, (Micklos, 2003)). Se usaron 100  $\mu$ l de bacterias competentes DH5 $\alpha$  que fueron incubadas durante 30 minutos en hielo con los 10  $\mu$ l de los plásmidos obtenidos por ligación. Inmediatamente después, los tubos con la mezcla fueron incubados por 2min a 42° C e inmediatamente vueltos a colocar en hielo por 10min adicionales. Las bacterias transformadas fueron incubadas por 1hr a 37° C en agitación constante (150rpm) posterior a la

adición de 300  $\mu$ l de medio LB líquido (medio Luria-Bertani: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl en 1 Lt; para obtener medio sólido se adicionan 15 g de bactoagar. Ambos medios se ajustan a pH 7 con NaOH). Las bacterias recuperadas se plaquearon en cajas de medio LB con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina y se dejaron incubando de 14 a 16 hrs a 37° C.

Las bacterias transformadas y que potencialmente tienen los plásmidos pGB3 N-ter  $\alpha_{1D}$ AR y pGB3 C-ter  $\alpha_{1D}$ AR fueron procesadas, para recuperar los plásmidos puros, por la técnica de miniprep de QIAGEN. La concentración y pureza de los plásmidos se determinó utilizando un espectrofotómetro (Beckman modelo DU 650), las lecturas se realizaron a 260 nm y sólo se utilizaron las muestras cuya pureza (indicada por el cociente  $A_{260/280}$ ) se encontró entre 1.6-1.9 La eficiencia de la ligación se determinó por una digestión diagnóstica con enzimas de restricción BamHI (ROCHE) y EcoRI (realizada bajo las condiciones previamente descritas), la digestión permitió verificar la identidad de los plásmidos recombinantes, pGB3 N-ter  $\alpha_{1D}$ AR y pGB3 C-ter  $\alpha_{1D}$ AR, mediante el análisis de electroforesis en gel de agarosa.

Los plásmidos fueron secuenciados en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (para corroborar, por alineamiento de la secuencia obtenida con la secuencia ya conocida del  $\alpha_{1D}$ -AR, la correspondencia de las regiones de interés del receptor).

## **II. Pruebas preliminares de la técnica del doble híbrido.**

El sistema de doble híbrido en levadura permite determinar interacciones proteína-proteína; el método se basa en la reconstitución del factor transcripcional Gal-4 que favorece la expresión de genes reporteros que dan a la levadura la capacidad de crecer en medios restrictivos carentes de Histidina (-H) y/o Adenina (-A) así como la síntesis de  $\alpha$ -Galactosidasa que en presencia de X $\alpha$ -Gal da lugar a una coloración azul (el sistema matchmaker 3 exhibe estas características, las cuales pueden variar al usar otros sistemas). En este sistema, el DNA

correspondiente a las regiones N o C-terminales del  $\alpha_{1D}$ -AR (usadas como carnadas) está fusionado al dominio de unión a DNA Gal-4 (DNA-BD), mientras que otro gen proveniente de una librería de corazón (que codifica para proteínas; entre las cuales se encuentran aquellas con posible afinidad por el  $\alpha_{1D}$ AR, proteínas cuyo cDNA se encuentra clonado en el sistema), está fusionado al dominio activador GAL-4 (AD). La interacción entre la carnada y la presa dentro de una levadura permiten la aproximación de los dominios activador y de unión a DNA causando la reconstitución del factor transcripcional Gal-4 y la expresión de genes reporteros (Fig. 11).

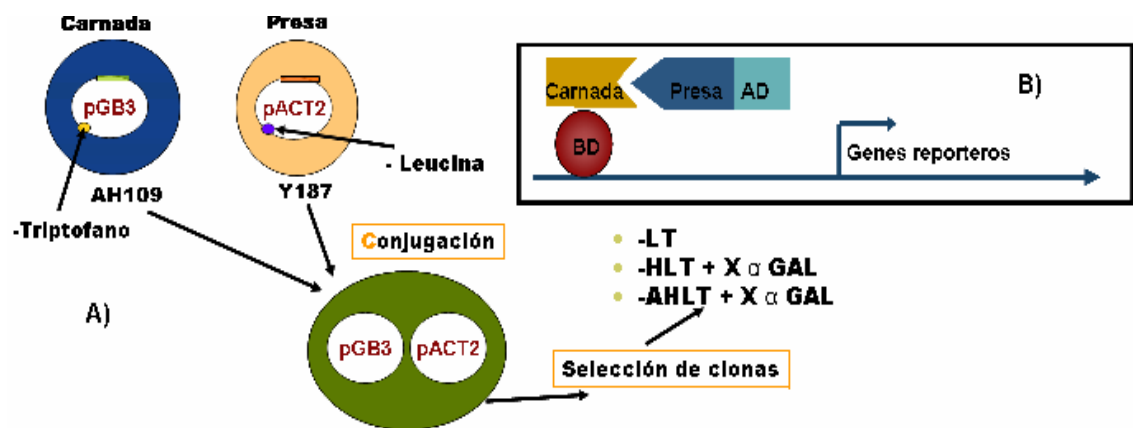


Fig. 11. Representación gráfica del sistema del doble híbrido en levadura.

La interacción entre 2 proteínas permite la reconstitución del factor transcripcional Gal-4 y el crecimiento de las levaduras en medios restrictivos. Posteriormente la identidad de la proteína que mostró afinidad por aquella que se usó como carnada, se determina por la secuenciación del plásmido.

Se efectuaron pruebas preliminares para determinar la factibilidad de usar los dominios N y C-ter del  $\alpha_{1D}$ -AR como carnadas en el sistema del doble híbrido en levadura. Las pruebas consistieron en transformar el vector pGAD T7 (Clontech) en levaduras *S. cerevisiae* de la cepa AH109 que ya contienen la carnada correspondiente, en esta situación no se espera crecimiento en los medios restrictivos -HLT o -AHLT. El crecimiento en medios restrictivos indicaría que las carnadas pueden activar directamente el sistema al encender por si mismas los genes reporteros, impidiendo que fuese factible usar dichas proteínas como carnadas en el sistema del doble híbrido en levadura.

Inicialmente, para la transformación de levaduras AH109 con los plásmidos pGB3 N-ter  $\alpha_{1D}$ AR y pGB3 C-ter  $\alpha_{1D}$ AR (carnadas); una colonia de levaduras se inoculó en 5 ml de medio líquido DOB y se dejaron a 30° C en agitación (150 rpm) de un día para otro, el cultivo se escaló inoculando 1 ml en 50 ml de medio DOB. Transcurridas aproximadamente 48 hrs, los frascos se centrifugaron a 2500 rpm durante 5min y se desechó el sobrenadante, las levaduras se resuspendieron en 20 ml agua estéril y se volvieron a centrifugar para retirar el agua, la levaduras empaquetadas se resuspendieron con 4 ml de agua estéril y se transfirieron 5 ml a un tubo falcon nuevo, centrifugándolo nuevamente a 2500 rpm durante 5min para retirar el agua. A la pastilla obtenida se agregó 1ml de Acetato de Litio 100 mM, se resuspendió gentilmente. Para cada reacción se usaron 50  $\mu$ l de levaduras, se agregaron 240  $\mu$ l de polietilenglicol (PEG) al 50%, 36 $\mu$ l de Acetato de Litio (1M), 50  $\mu$ l de DNA de cadena simple (DNAss), 33  $\mu$ l de agua estéril y 1  $\mu$ l del plásmido correspondiente a cada reacción (pGB3 N-ter  $\alpha_{1D}$ AR o pGB3 C-ter  $\alpha_{1D}$ AR). Los tubos con las reacciones se dejan incubando, a 30° C por 30 min, invirtiendo los tubos de 3-4 veces cada 10 min, posteriormente se colocaron a 42° C por 30 min adicionales y a continuación fueron centrifugados durante 30 seg a no más de 6000 rpm, se eliminó el sobrenadante y las levaduras se resuspendieron en 1ml de agua estéril, de esta suspensión se plaquearon 100  $\mu$ l en medio DOBA sin leucina (-L, restrictivo para levaduras que contengan el plásmido pGB3, es decir la carnada). Posteriormente fueron transformadas con el vector pGAD T7 y se plaquearon en medio DOBA sin leucina ni triptofano (-T, restringe el crecimiento a levaduras que presentan el plásmido proveniente de la librería). Una vez que las colonias crecieron, se resuspendió una de las colonias de los diferentes plásmidos a probar en 1ml de agua estéril y se plaquearon aproximadamente 5  $\mu$ l en cajas con medio DOBA -HLT y -AHLT cubiertas con X $\alpha$ -Gal. Las cajas se dejaron incubando a 30° C por aproximadamente 48 hrs.

**III. Identificación de proteínas con afinidad por los dominios amino y carboxilo del  $\alpha_{1D}$  AR mediante el tamizaje con una librería de cDNAs de corazón.**

Una vez que se comprobó la factibilidad de utilizar los dominios N y C-ter del receptor como carnadas en el sistema del doble híbrido en levadura, se procedió a realizar el tamizaje con la librería de cDNAs de corazón.

Se crecieron levaduras *S. cerevisiae* de la cepa AH109, previamente transformadas con las carnadas, en 5 ml de medio DOB -T por aproximadamente 48 hrs, se tomaron 1.5 ml del cultivo y se escaló a un frasco con 50 ml de medio, preparándose 3 frascos para cada carnada. Se centrifugó el contenido de los frascos y se juntó según su contenido en un solo tubo.

Previamente al tamizaje, se tituló la librería de cDNAs de corazón (MATCHMAKER system de CLONTECH) tomando 10  $\mu$ l del vial y se diluyeron en 990  $\mu$ l de agua estéril, de este tubo se tomaron 10  $\mu$ l y se diluyeron nuevamente en 990  $\mu$ l, esta operación se repitió hasta completar 5 diluciones, se tomaron 10  $\mu$ l de cada dilución y se plaquearon en medio DOB -L.

Las levaduras transformadas con las carnadas fueron conjugadas posteriormente con levaduras de una librería de cDNAs de corazón (que contienen potenciales cDNAs presas). Para la conjugación se tomó la mitad del vial (500  $\mu$ l) de la librería y se agregaron a cada uno de los tubos conteniendo levaduras con las carnadas N o C-ter del  $\alpha_{1D}$ -AR, el contenido de los tubos se mezcló y se centrifugó a 2000 rpm por 10 min, los tubos se dejaron incubando de 1-2hrs. Posteriormente el contenido de los tubos se vertió por separado en cajas de 150 mm y se les adicionó medio YPD, hasta tener 50 ml totales. Las cajas se dejaron incubando a 30° C de 20-24 hrs y a 38 rpm para permitir el proceso de conjugación.

Transcurrido el tiempo de la conjugación, las levaduras se plaquearon en cajas con medio DOBA -HLT y -AHLT, que permitió la selección de colonias de levaduras que potencialmente expresan proteínas con interacción por los dominios N o C-ter del  $\alpha_{1D}$ -AR. Después de 2 semanas, las colonias obtenidas se seleccionaron por dilución en medio restrictivo (en el cual fueron aisladas, DOB -HLT o -AHLT), las clonas que mantuvieron su crecimiento durante tres

diluciones se gotearon en medio sólido -HLT y -AHLT con X $\alpha$ -Gal para seleccionar las clonas por presencia de  $\alpha$ -Galactosidasa, es decir por su coloración azul.

#### IV. Confirmación de interacciones

Las colonias de levaduras que presentaron coloración azul se crecieron en 5ml de medio DOB -HLT, en las condiciones mencionadas, por aproximadamente 48 hrs. Se purificaron de las levaduras (Vazquez-Prado, 2004 #171) (Vazquez-Prado *et al.*, 2004) los plásmidos con los cDNAs presas de las clonas seleccionadas utilizando el kit zymoprep de Zymo Research. Posteriormente se utilizó el plásmido obtenido de levaduras para transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  con el protocolo descrito y se plaquearon en cajas con medio LB con ampicilina 100  $\mu$ g/ml.

Los plásmidos se purificaron de las bacterias (por lisis alcalina con NaOH y fueron separados de lípidos y proteínas al adicionar ácido acético; (Micklos, 2003)) de usando el kit para minipreps de QIAGEN, se transformaron en paralelo levaduras AH109 que expresaban los plásmidos pGB3 N-ter  $\alpha_{1D}$ AR y pGB3 C-ter  $\alpha_{1D}$ -AR así como levaduras con el vector pGB3 vacío (como control negativo), para verificar que la activación de genes reporteros no está dada por la presencia del cDNA proveniente de la librería, sino por la interacción específica con la proteína de interés. Las levaduras transformadas se gotearon por pares en cajas con medio DOBA -LT, -HLT y -AHLT con X $\alpha$ -Gal en los dos últimos casos.

Se escogieron los cDNAs de levaduras que presentaban crecimiento y coloración azul sólo al ser transformados en levaduras con las carnadas y que además no crecían al ser transformadas en levaduras conteniendo el vector vacío pGB3. Estos cDNAs presas de las clonas con interacción específica por los dominios de interés del  $\alpha_{1D}$ -AR fueron mandados a secuenciar y las secuencias fueron sometidas a análisis informático de alineación de secuencias contra una base de datos utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool,



disponible públicamente en el sitio de internet [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/MmBlast.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/MmBlast.html)) para definir su identidad; se seleccionaron las clonas que por su identidad resultaron interesantes o que no había motivos para descartar.

## **V. Subclonación de los cDNAs aislados en vectores de expresión para células de mamífero.**

Los cDNAs seleccionados del análisis informático fueron cortados con enzimas de restricción Eco RI - Xho I (ROCHE) y subclonados por ligación en el vector pCMV Myc (CLONTECH) para su posterior estudio en células HEK 293-T.

## **VI. Pruebas para determinar la expresión de las clonas en células HEK 293-T.**

Las células HEK 293-T (células de riñón de embrión humano) fueron transfectadas con liposomas catiónicos (Felgner *et al.*, 1987) utilizando reactivo para transfección polyfect de QIAGEN. Se utilizaron cajas subconfluentes de 100 mm (una caja por cada cDNA a transfectar), divididas un día antes de la transfección con 1 ml de tripsina- EDTA 1x (Sigma-Aldrich) y neutralizando con 4 ml de medio DMEM (Dulbelco's Modified Eagle Medium de Sigma-Aldrich) con suero fetal bovino al 10%, de esta suspensión se tomó 1 ml y se sembró en cajas de 100mm pretratadas con 2ml de poli-D-Lisina (Sigma-Aldrich) y lavadas con PBS 1X (buffer salino de fosfatos, de Sigma-Aldrich). Las células se dejaron en incubación a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las reacciones para la transfección se realizaron en tubos de polipropileno de 5 ml, por cada cDNA a transfectar se utilizaron 300 µl de DMEM sin suero para diluir 25 µl de polyfect, se agregaron 4 µg de cDNA correspondiente a cada una de las clonas en los diferentes tubos, agitando y dejando incubar por 10min.

Durante el periodo de incubación se lavaron con PBS 1X (2 ml) las cajas con células HEK 293-T previamente divididas y se agregó 7 ml de DMEM con suero al 10% a cada caja. Transcurrido el tiempo de incubación de las reacciones

de transfección, se agregó 1 ml de DMEM con suero al 10% a cada tubo, se mezcló el contenido y se decantó por separado en cada caja y se dejaron en incubación, las cajas fueron procesadas 48 hrs después de la transfección.

Las células fueron lisadas con buffer de muestra 1X (4 ml de SDS al 10%, 2 ml de glicerol, 1.2 ml de Tris 1M a pH 6.8, 2.8 ml de agua destilada, agregar azul de bromofenol a una concentración final de 0.01% y 2 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol, diluir 4 veces en agua destilada) calentado a baño María hirviendo por 5min, los lisados celulares fueron almacenados a  $-20^{\circ}$  C hasta su utilización. Se preparó un gel SDS-PAGE al 15% en casets para mini geles (Amersham Biosciences) y después de hervir por 5 min a baño maría los lisados celulares, se cargaron 30  $\mu$ l de cada una de estas muestras en los diferentes carriles dejando un carril del gel para colocar 10  $\mu$ l del marcador de referencia See Blue Plus 2 (Invitogen). El gel se corrió a 35 mA por aproximadamente 90min en cámaras de electroforesis para minigeles verticales (modelo Hoefer Dual Cell Caster de Amersham bioscience) con buffer de corrida SDS-PAGE 1X (25 mM de Trisma base, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS y se ajusta el pH a 8.3).

Las proteínas del gel se transfirieron mediante la técnica de Western blot a una membrana de inmobilon-P (Millipore) previamente hidratada en metanol al 100%, el blot se realizó en una cámara de transferencia (modelo Trans-Blott Cell de Bio-Rad) conteniendo buffer de transferencia 1X (Trizma base 25 mM, 192 mM de glicina y 20% de metanol) a 320 mA por 150 min, después de la transferencia las membranas fueron bloqueadas con leche Svelty al 5% en TBS Tween 0.05% (Tris-HCl 10 mM, NaCl 1 M, se ajusta a pH 7.4 con HCl, se toman 200 ml esta solución, aforando posteriormente a 2 lt finalmente se agrega 1 ml de Tween) durante 1 hr en agitación constante (aproximadamente 30 rpm), transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS Tween 0.05% en agitación (150 rpm). Inmediatamente después las membranas fueron incubadas por 2 hrs con el primer anticuerpo, en este caso anti Myc (dirigido contra ese epitope fusionado a cada una de las clonas aisladas en el tamizaje) a una dilución 1:3,000 en TBS Tween 0.05% con BSA 0.5% (albúmina de suero bovino), se realizaron 4 lavados de 5min con TBS Tween al 0.05% en agitación constante para continuar la

incubación de la membrana con el anticuerpo secundario (Goat anti mouse) a una dilución 1:10,000 en TBS Tween al 0.05% por 1hr, se realizaron otros 4 lavados de 5 min con TBS Tween al 0.05% y finalmente uno con TBS Tween al 1%.

El revelado del Western blot se hizo con un reactivo quimioluminiscente en presencia de peroxidasa del kit SuperSignal West Pico (Pierce), lo cual nos permitió ver por quimioluminiscencia la presencia de las proteínas contra las que fue dirigido el anticuerpo (anti-Myc) y calcular su peso aproximado por comparación con el marcador de referencia. Se confirmó la expresión y peso (calculado por análisis informático) de cada una de las clonas en células HEK 293-T. El revelado se hizo exponiendo placas Kodak (Medical X-Ray General Purpose Blue) por diferentes lapsos de tiempo (10 seg, 30 seg y 1 min) y en oscuridad al contacto directo con la membrana de inmobilon-P, previamente incubada con los reactivos del kit y envuelta en kleen pak, utilizando un casete para autoradiografía. Las placas fueron fijadas (GBX fixer and replenisher de Kodak) por aproximadamente 1 min, lavadas con agua corriente y reveladas (GBX developer and replenisher de Kodak) en la oscuridad.

## VII. Clonación del cDNA del receptor $\alpha_{1D}$ -AR completo.

Para la elaboración de experimentos posteriores evaluando los efectos de algunas clonas aisladas en el tamizaje, el  $\alpha_{1D}$ -AR fue clonado a vectores de expresión en células de mamífero pCEFL HA y pCEFL 3XFLAG (construido por el Dr. Vázquez, sustituyendo el sitio de multiclonación del vector p3XFLAG-Myc-CMV de Sigma por el del vector pCEFL EGFP, del laboratorio del Dr. Silvio Gutkind en el NIH, desde el sitio Hind III al Xba I que incluye la EGFP y posteriormente se amplificó por PCR desde el sitio 3XFLAG al XbaI insertando un sitio PAK antes del 3XFLAG, Fig. 12).

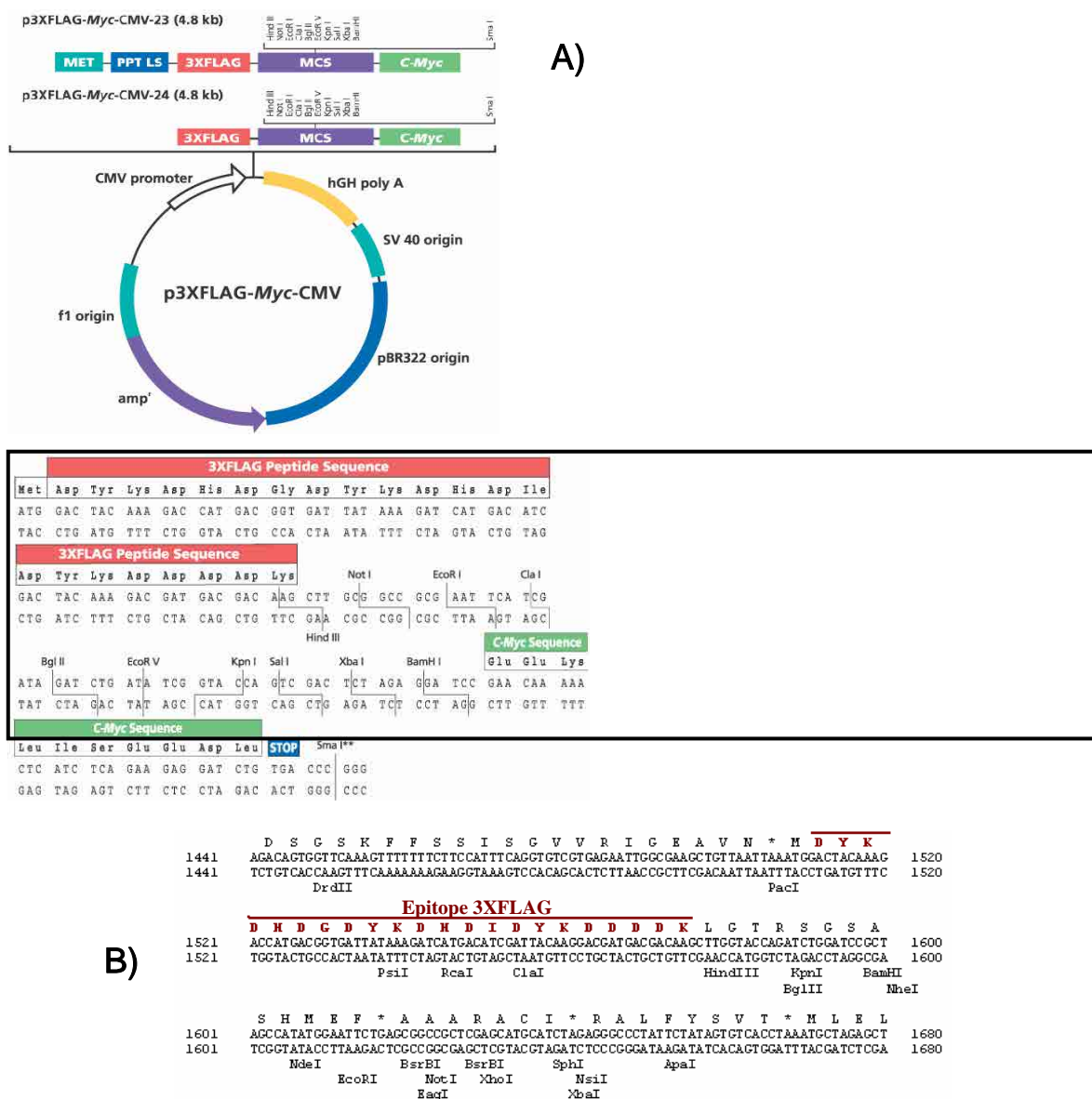


Fig 12. Construcción del vector pCEFL 3XFLAG-Myc-CMV. A) Vector p3XFLAG-Myc-CMV y su sitio de multiconación y B) Sitio de multiconación del vector pCEFL-P-3XFLAG.

### VIII. Efecto de las clonas aisladas sobre la distribución celular del $\alpha_{1D}$ -AR.

Inicialmente se sembraron células HEK 293-T (20  $\mu$ l, partiendo de una caja de 100 mm dividida con 1 ml de tripsina EDTA 1X y neutralizada con 9 ml de DMEM con suero) en cámaras de inmunofluorescencia pretratadas con fibronectina a una concentración de 10  $\mu$ g/ml (preparada en PBS 1X). Al día siguiente las células fueron cotransfectadas (según el protocolo previamente descrito, ajustando el volumen de los reactivos al área de las cámaras) con el DNA del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR y el de alguna clona (1DNI-25 y 1DNI-15). Paralelamente

se transfectaron células HEK 293-T para analizar la distribución del receptor y usarlo como control.

Después de transcurridas 48 hrs a partir de la transfección, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 20 min, posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X durante 5 min. Las células fueron permeabilizadas con metanol al 100% frío durante 6 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ , inmediatamente se efectuaron 5 lavados (de 5 min cada uno) con PBS 1X. Se realizó el bloqueo, para disminuir el pegado inespecífico de los anticuerpos, con BSA al 1% en PBS 1X durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , a continuación las células fueron incubadas con el anticuerpo primario (anti HA de Covance, dirigido contra el epítipo HA fusionado al  $\alpha_{1D}\text{-AR}$ ), a una dilución 1:300 en PBS 1X con BSA al 0.5%, por 1 hr a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las células fueron lavadas 5 min en las condiciones descritas, las células se incubaron en la oscuridad (de aquí en adelante las células se mantuvieron lejos de la luz directa) a temperatura ambiente durante 40min con el anticuerpo secundario (FITC) en BSA a una dilución 1:500. Nuevamente se realizaron 5 lavados con PBS 1X de 5 min cada uno y tres lavados instantáneos con agua ultrapura, inmediatamente las células fueron montadas con Vecta-Shield (Burlingame laboratories). Al día siguiente las preparaciones fueron selladas con barniz transparente, cubiertas de la luz y guardadas a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta ser observadas en el microscopio confocal, las imágenes se analizaron usando el programa Leica confocal software.

#### **IX. Evaluación del efecto de las proteínas aisladas, por el sistema del doble híbrido, sobre la función del $\alpha_{1D}\text{-AR}$ por la técnica de fosfatos de inositol.**

De manera inicial se hizo un curso temporal y se evaluó la cantidad de DNA del receptor mínima a utilizar para observar un efecto claro al estimular con L-(-)-Norepinefrina monohidratada en sal (Sigma-Aldrich).

La técnica de medición de fosfatos de inositol nos permitió evaluar de manera cuantitativa, al estimular con el agonista norepinefrina, la actividad del  $\alpha_{1D}\text{-}$

AR al ser cotransfectado con los diferentes cDNAs de las clonas aisladas por el sistema del doble híbrido.

El primer día se sembraron cajas de 100 mm con 3 ml de células HEK 293-T (divididas con 1 ml de tripsina y 9 ml de DMEM con suero) y se dejaron incubando a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. El segundo día las células fueron cotransfectadas con el DNA del receptor  $\alpha_{1D}$  y el de alguna de las clonas (1DNI-15 o 1DNI-25), para cada transfección se usaron 4  $\mu$ g del DNA de la clona más 1  $\mu$ g de DNA del receptor, completando con vector vacío (pCEFL) a 8 $\mu$ g de DNA totales. Paralelamente se transfectaron células con 1  $\mu$ g de plásmido conteniendo el cDNA del receptor y completando con vector vacío a 8  $\mu$ g de DNA total, para ser usadas como control.

El tercer día las células HEK 293-T ya transfectadas con los diferentes cDNAs se dividieron con 1 ml de tripsina EDTA 1X usando 2 ml de DMEM con suero al 10% para neutralizar la reacción, las células fueron resuspendidas muy bien para evitar aglomerados. Se incubaron en cajas de cultivo de 12 pozos con poli-D-lisina, se lavaron con PBS 1X y posteriormente a cada pozo se agregó 1 ml de la suspensión, las cajas se incubaron a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 o 7 hrs.

A partir de este punto todas las cajas y el material usados se manejaron con las precauciones necesarias para el trabajo con radioactividad. Transcurrido el tiempo y una vez que las células se adhirieron a las cajas, se retiró el medio y se agregó 1ml de DMEM con myo-inositol tritiado (3  $\mu$ Ci/ml) a cada pozo, las cajas se dejaron incubando a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para cada clona se sembraron 6 pozos, donde 3 sirvieron de control (sin estimular).

El cuarto día se retiró el medio con el myo-inositol y las células se dejaron incubando por 40 min a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en PI 1X (PI 2X; 119 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 20 mM de LiCl, 5.6 mM de glucosa, 0.4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25 mM de PIPES y 40 mM de NaOH, se ajusta el pH a 7.2) 1 ml por pozo, posteriormente se estimularon las células correspondientes con 10  $\mu$ M de NE (concentración final) en

PI 1X (1 ml por pozo) por 30 min, las células se incubaron en las condiciones mencionadas.

Una vez transcurrido el tiempo, se retiró la solución de estímulo y las placas fueron colocadas en una cama de hielo donde se agregó a cada pozo 1 ml de una solución conteniendo cloroformo-metanol (2:1) fría, las cajas permanecieron en estas condiciones por 20min más, para permitir la fijación y lisis de las células.

El contenido de cada pozo se transfirió a tubos de polipropileno de 5 ml (previamente etiquetados), una vez hecho esto se añadieron 700  $\mu$ l de agua y 700  $\mu$ l de cloroformo a cada tubo, posteriormente se mezclaron en vortex por aproximadamente 30 seg. Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 10min, para permitir la separación de las fases acuosa y lipídica.

Para la purificación de fosfatos de inositol, se usaron columnas (Bio-Rad) según el número de muestras a procesar. A las columnas se agregó 1ml de resina diluida en agua (21 g de resina en 100 ml de agua mQ), posteriormente se lavó cada columna dos veces, con 5 ml de agua milliQ. Se agregó la fase acuosa (en la parte superior) de cada uno de los tubos a las columnas correspondientes y se hizo nuevamente un lavado con 5 ml de agua milliQ. Las columnas se colocaron sobre viales limpios para la recolección de las muestras, a las columnas se agregaron 2 ml de PI2 (1 M de formato de amonio y 100 mM de ácido fórmico) para eluir los fosfatos de inositol, las columnas fueron retiradas y se agregaron 10 ml de líquido de centelleo a cada vial. Los viales se llevaron al contador de centelleo.

Una vez que se obtienen las cuentas por minuto en cada vial, los resultados fueron procesados usando el software GraphPad Prism versión 4.03. Los resultados fueron normalizados al por ciento del basal.

## Resultados:

### I. Clonación de los dominios N y C-ter del $\alpha_{1D}$ -AR.

En la base de datos de NCBI se encuentra disponible la secuencia del cDNA que codifica para el receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$ , con el número de identificación [NM\\_000678](#), la secuencia de este receptor es de 1719pb, donde la región que codifica para el dominio amino terminal tiene una longitud de 294pb y la región que codifica para el carboxilo terminal de 504pb. En la imagen se muestran en color gris la región N-ter y en negro la correspondiente al C-ter amplificadas por PCR.

```

      10      20      30      40      50      60
1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   atgactttccgcgatctcctgagcgtcagtttcgagggaccccgcccgacagcagcgca
      70      80      90      100     110     120
61  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   gggggctccagcgcgggcggcggggggcagcgcggggcggcgcccccctcggagggc
      130     140     150     160     170     180
121 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   ccggcgggtgggcggcgtgccgggggcccggggcggcgggcggcggcggtgggcgccaggc
      190     200     210     220     230     240
181 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   agcggcggaggacaaccggagctccgcggggggagccggggagcgcggggcgcggggcgccgac
      250     260     270     280     290     300
241 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   gtgaatggcacggcggccgtcgggggactggtggtgagcgcgcagggcgtgggcgtgggc
      310     320     330     340     350     360
301 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   gtcttctctggcagccttcattccttatggcctggcaggtaacctgcttgtcatcctctca
      370     380     390     400     410     420
361 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   gtggcctgcaaccgccacctgcagaccgtcaccaactatttcacgtgaacctggccgtg
      430     440     450     460     470     480
421 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   gccgacctgctgctgagcgcaccgactgccccttctcggccaccatggaggttctgggc
      490     500     510     520     530     540
481 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   ttctgggcctttggccgcgccttctgcgacgtatgggcccgcctggacgtgctgtgctgc
      550     560     570     580     590     600
541 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   acggcctccatcctcagcctctgcacatctccgtggaccggtacgtgggctgctgcccac
      610     620     630     640     650     660
601 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   tcaactcaagtaccagccatcatgaccgagcgcaaggcggccgcatcctggccctgctc
      670     680     690     700     710     720
661 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   tgggtcgtagccctggtggtgtccgtagggcccccctgctgggctggaaggagcccctgccc

```



730 740 750 760 770 780  
721 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
cctgacgagcgcttctgcggtatcaccgaggaggcgggctacgctgtcttctcctccgtg

790 800 810 820 830 840  
781 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
tgctccttctacctgccccatggcgggtcatcggtggtcatgtactgccgctgtacgtggtc

850 860 870 880 890 900  
841 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
gcgcgagcaccacgcgagcctcgaggcaggcgtcaagcgcgagcgaggcaaggcctcc

910 920 930 940 950 960  
901 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
gaggtggtgctgcgcatccactgtcgcgggcgggccacgggcgccgacggggcgacggc

970 980 990 1000 1010 1020  
961 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
atgcgagcgccaagggccacacctccgcagctcgctctccgtgcgctgctcaagttc

1030 1040 1050 1060 1070 1080  
1021 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
tcccgtgagaagaaagcggccaagactctggccatcgctcggtgggtgtcttctgctctgc

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
1081 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
tggttccctttcttcttctgtcctgccgctcggctccttgttcccgcagctgaagccatcg

1150 1160 1170 1180 1190 1200  
1141 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
gagggcgctctcaaggtcatcttctggctcggctacttcaacagctgctgaaccgctc

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
1201 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
atctaccctgttcc**agccgaggttcaagcgccttccctccgtctcctgcgctgccag**

1270 1280 1290 1300 1310 1320  
1261 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
**tgccgtcgtcgcccggcggcggcctctctggcgtgtctacggccaccactggcgggccc**

1330 1340 1350 1360 1370 1380  
1321 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
**tccaccagcggcctgcccaggactgcccaggttcggggcagcggcccccgagcg**

1390 1400 1410 1420 1430 1440  
1381 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
**ccgctggccctcaccgctccccgacccccgacccccgaacccccaggcagccccgagatg**

1450 1460 1470 1480 1490 1500  
1441 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
**caggctccggtcgccagccgtcgaaagccaccagcgccttccgaggtggaggctgctg**

1510 1520 1530 1540 1550 1560  
1501 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
**gggcccgttccggagaccacgaccagctgcccggcgaaggtctccagcctgtcgacaag**

1570 1580 1590 1600 1610 1620  
1561 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
**atccgcccggggcgcgagcgcgagaggcagcgtgcccagcgtcagaggtggag**

1630 1640 1650 1660 1670 1680  
1621 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
**gctgtgtccctaggcgtcccacagaggtggccgagggcgccacctgccaggcctacgaa**

1690 1700 1710  
1681 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
**ttggccgactacagcaacctacgggagaccgatatttaa**

El programa SMART permitió analizar la secuencia de aminoácidos del receptor, pudiendo de esta manera definir los dominios de interés, donde la región amino terminal esta constituida por los primeros 98 aminoácidos y la región carboxilo terminal está representada por los últimos 168 aminoácidos, con pesos moleculares de 8.37kDa y 18.63kDa respectivamente.

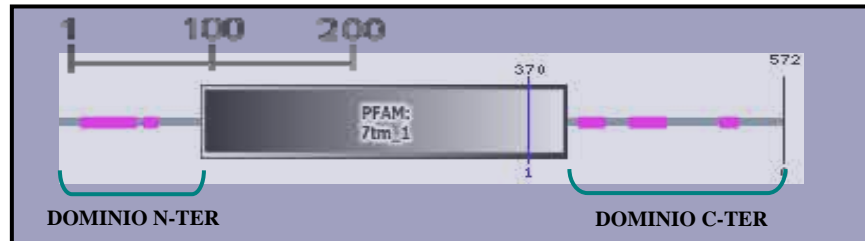


Fig. 13. Representación bidimensional de la estructura por dominios del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR, imagen obtenida del análisis de la secuencia con el programa SMART.

El análisis de la secuencia de cDNA que codifica para el receptor usando el programa Bio Edit permitió determinar la composición de nucleótidos de los dominios de interés (Fig. 14) y el establecimiento de las condiciones necesarias para la amplificación de los fragmentos por PCR. La composición de nucleótidos guanina-citosina de la región que codifica para el dominio N-ter constituye el 81% del total, mientras la adenina y timina solo representan el 18.71%.

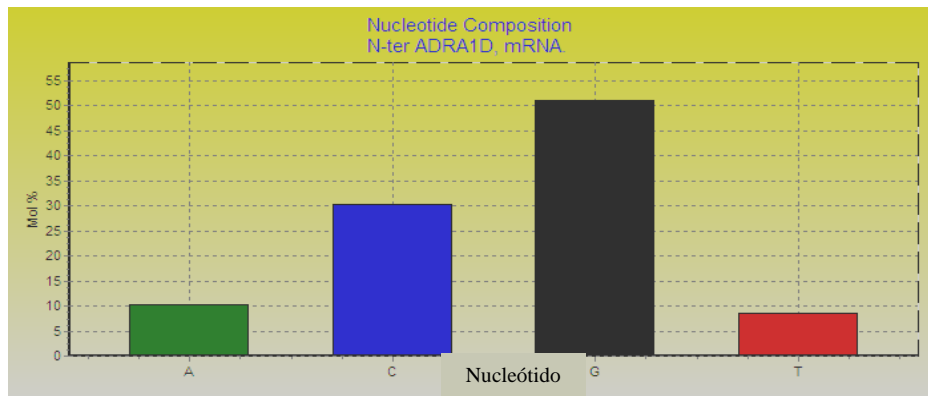


Fig. 14. Composición de nucleótidos de la región amino terminal.

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa Bio Edit, para la región que codifica para el N-ter se usaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación por PCR, en el lado 5' ATAGCTAGCATGACTTTCCGCGATCTCCTGAGCG y 3' ATAGAATTCTCAGCCCAGCCCTGCGCGCTCACC y para la región que codifica para el C-ter ATAGCTAGCAGCCGCGAGTTCAAGCGCGCC y

ATAGAATTCTTAAATATCGGTCTCCCGTAGGTTGC para las regiones 5' y 3' respectivamente.

El análisis electroforético permitió determinar que los productos de PCR corresponden en tamaño al cDNA de las regiones N-ter y C-ter del  $\alpha_{1D}$ AR. De acuerdo al análisis *in silico*, el cDNA de la región amino terminal del  $\alpha_{1D}$ AR tiene un tamaño de 294 pb y el de la región carboxilo terminal de 503 pb (Fig. 15A). Estos fragmentos fueron clonados en el vector pGB3 y por análisis electroforético se verificó el tamaño tanto del vector como de las regiones N y C-ter del receptor (Fig. 15B)

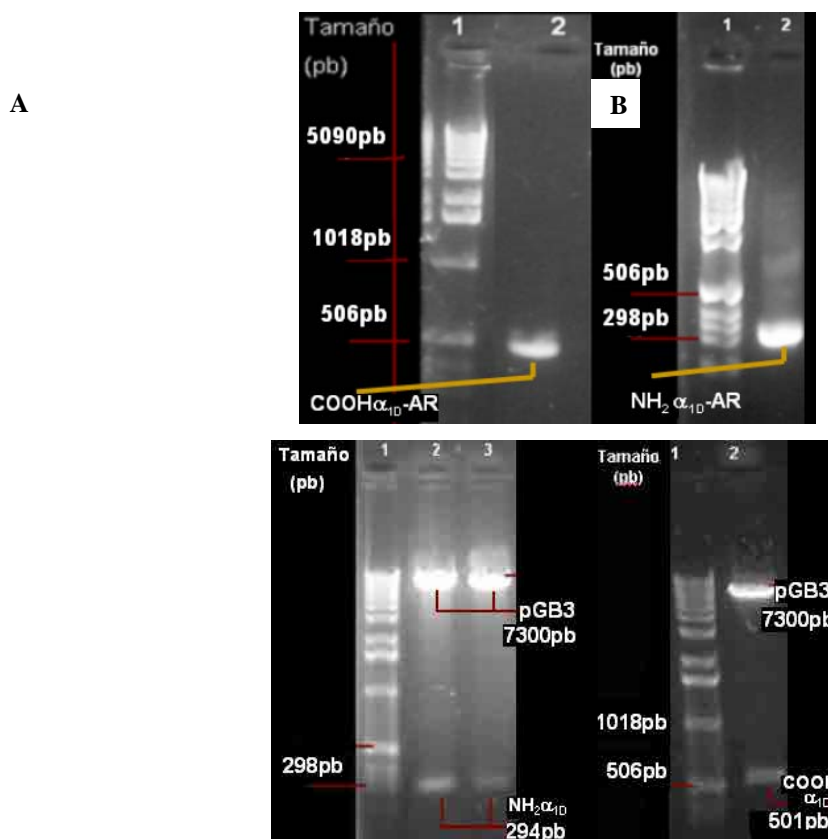


Fig. 15. Análisis electroforético del cDNA correspondiente a los fragmentos carboxilo y amino terminal del  $\alpha_{1D}$  AR amplificados por PCR (A). En B se observa la clonación de los cDNAs, mostrados en A, en el vector pGB3.

## II. Pruebas preliminares de la técnica del doble híbrido

De manera inicial, y para proceder al tamizaje entre las levaduras de la librería con levaduras que expresan los dominios N o C-terminales, se comprobó

la factibilidad para emplear estos dominios del receptor como carnadas en el sistema del doble híbrido en levadura (Fig. 16). Estos no promovieron por si mismos la activación de los genes reporteros usados en la detección de interacciones específicas. En la imagen se observa que no hubo activación inespecífica del sistema debido a la presencia de las carnadas.

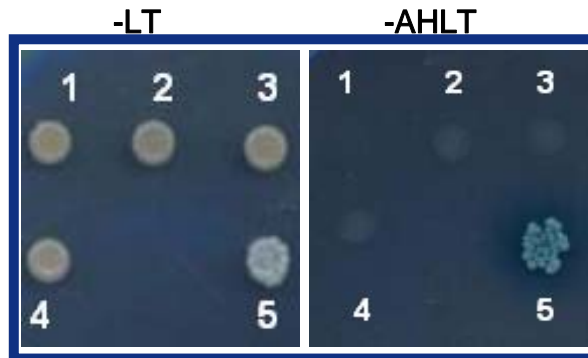


Fig. 16. Determinación de la factibilidad de usar las regiones amino y carboxilo terminal del  $\alpha_{1D}$  AR en el sistema de doble híbrido en levaduras. Se observa el crecimiento de levaduras transformadas con 2 plásmidos, que permiten crecimiento en medio -LT, la imagen muestra que la transformación tuvo éxito pues las levaduras crecieron en -LT (panel izquierdo), solo las muestra en donde se reconstituye el factor Gal 4 crecen en medio restrictivo -AHLT (panel derecho). Las muestras indicadas con números corresponden a 1 pGB3-pGADT7 (control negativo), 2 y 3 pGB3 Nter  $\alpha_{1D}$ -AR- pGADT7, 4 pGB3 Cter  $\alpha_{1D}$ -AR- pGADT7 y 5, p53-pTD1 (control positivo).

### III. Tamizaje entre los dominios N y C-ter del $\alpha_{1D}$ AR con una librería de cDNAs de corazón.

Antes de realizar el tamizaje se tituló la librería de cDNAs de corazón, para verificar la viabilidad de la misma, en este caso se observó crecimiento en las dos primeras diluciones. En la segunda dilución se contaron 77 colonias de levaduras, lo que permitió calcular que el número de levaduras viables presentes en la librería era de  $7.7 \times 10^9$  (Fig. 17).



Fig. 17. Titulación de levaduras provenientes de la librería de corazón. Se observan las levaduras de las diluciones 1 (izquierda) y 2 (derecha) plaqueadas en cajas con medio DOBA -L.

En el caso de la titulación de levaduras transformadas con las carnadas se observó que estas presentan crecimiento en las primeras tres diluciones (Fig. 18). Se calculó que las levaduras transformadas para expresar el dominio N-terminal eran alrededor de  $7 \times 10^{10}$  al realizar el tamizaje, mientras que las levaduras que expresaban el dominio C-ter eran aproximadamente  $1.1 \times 10^{11}$ . Los datos anteriores nos permitieron calcular que por cada levadura proveniente de la librería había alrededor de 18.18 levaduras que expresaban el dominio N-terminal como carnada o aproximadamente 28.57 levaduras con la región C-terminal.

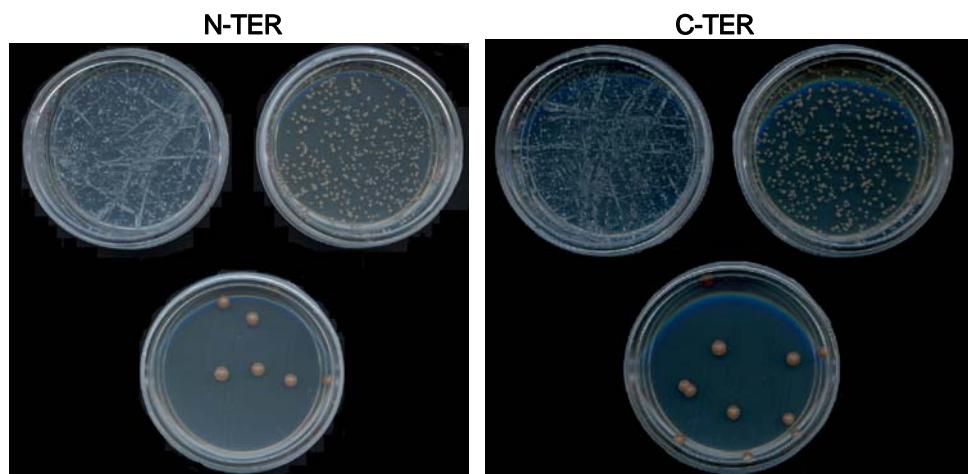


Fig. 18. Titulación de levaduras transformadas con las carnadas. En la parte superior se observan levaduras correspondientes a las diluciones 1 y 2, en la parte inferior levaduras de la tercera dilución plaqueadas en medio DOBA -T.

En cuanto al número de levaduras con el dominio N-terminal que se conjugaron, este llegó a  $1.1 \times 10^7$  y en el caso de las levaduras con el dominio C-terminal, fue de  $2.2 \times 10^7$ , de las  $3.85 \times 10^9$  levaduras disponibles para conjugarse con levaduras que expresaban las carnadas. La eficiencia de conjugación entre levaduras provenientes de la librería de corazón con las levaduras que expresan el dominio C-terminal como carnada, fue del doble con respecto a la eficiencia de conjugación con las levaduras que expresan el dominio C-terminal.

Inicialmente crecieron 40 colonias independientes a partir del tamizaje de la librería con levaduras que expresaban la región N-ter, estas colonias fueron aisladas a partir de cajas con medio DOBA -HLT. Del tamizaje con la región C-ter se aislaron 10 colonias independientes a partir de cajas con medio -HLT; para este dominio además de las clonas aisladas, para la prueba de confirmación de la

interacción específica se usaron otras proteínas aisladas en el laboratorio a partir de un tamizaje previo en el que se usó el C-terminal del receptor sensor de calcio.

#### IV. Confirmación de la especificidad de las interacciones “carnada-presa”.

Para la región N-terminal se confirmaron como positivas 24 interacciones entre la carnada y la presa, mientras que para el dominio C-terminal solo se obtuvieron 2 clonas que mostraron interacciones específicas, siendo estas con algunas de las proteínas definidas durante el tamizaje con el receptor sensor de calcio (Fig. 19). Esta prueba nos permitió descartar falsos positivos y seleccionar las clonas a secuenciar.

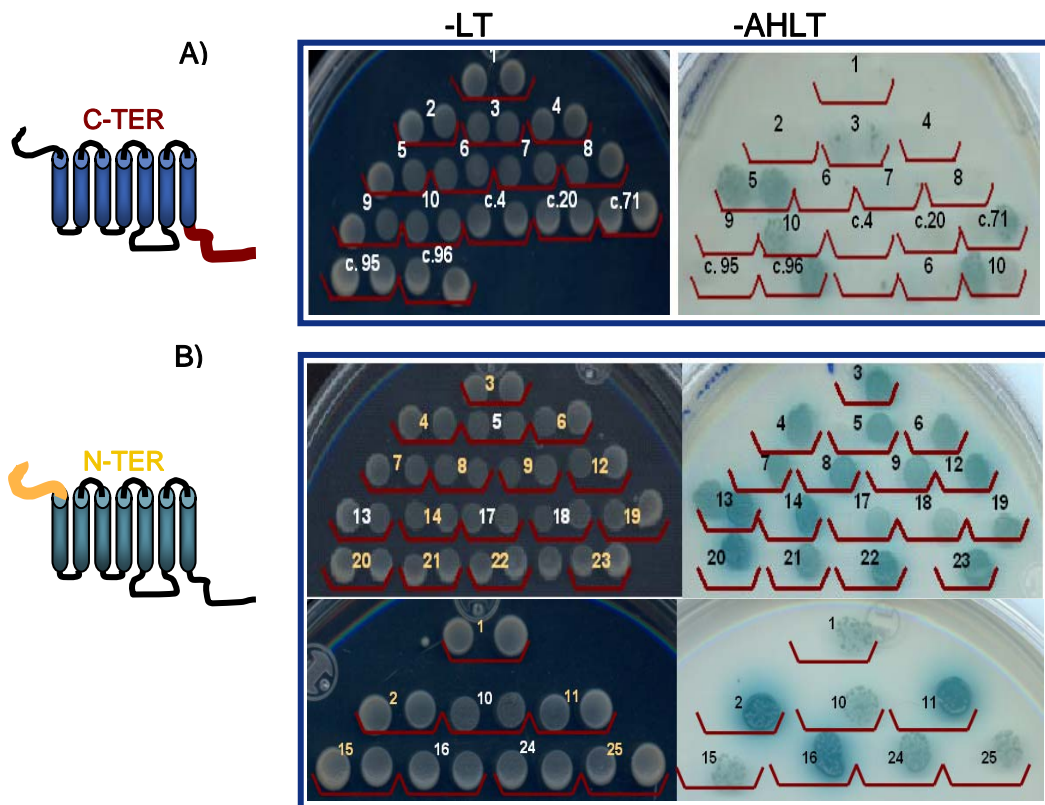


Fig. 19. Confirmación de la especificidad de las interacciones entre los dominios N o C-terminal del  $\alpha_{1D}$ -AR y las clonas aisladas de una librería de corazón por el sistema de doble híbrido. A) Confirmación de interacciones con clonas aisladas con la región C-Ter. B) Confirmación de interacciones con clonas aisladas con la región N-Ter. Los paneles de la izquierda corresponden a condiciones en que el crecimiento de las levaduras ocurre por la simple presencia de los plásmidos del sistema de doble híbrido, mientras en los paneles de la derecha el crecimiento ocurre solo si las proteínas codificadas en los plásmidos del sistema, interactúan entre sí y reconstituyen el factor Gal 4.

El análisis informático de las clonas secuenciadas permitió que se seleccionaran 7 clonas aisladas con la región amino terminal y 2 con la región carboxilo terminal del  $\alpha_{1D}$ -AR.

- Clonas aisladas con el dominio N-Ter

NO. DE CLONA	NOMBRE
1DNI-01	Proteína asociada a Adenilato ciclasa.
1DNI-04	Nebulette, variante 1
1DNI-09	Selenoproteína W
1DNI-15	Proteína F-box 7
1DNI-16	Filamina C
1DNI-23	KIAA0934
1DNI-25	Proteína F-box 22

- Clonas aisladas con el dominio C-Ter

NO. DE CLONA	NOMBRE
C. 71	Prosaposina
C.96	AMSH

## V. Subclonación de los cDNAs correspondientes a las presas y el receptor $\alpha_{1D}$ -AR en vectores de expresión para células de mamífero

Los cDNAs seleccionados del análisis informático fueron subclonados en el vector pCMV Myc y su expresión se comprobó en células HEK 293-T mediante un inmunoblot contra el epítipo Myc (Fig. 20).

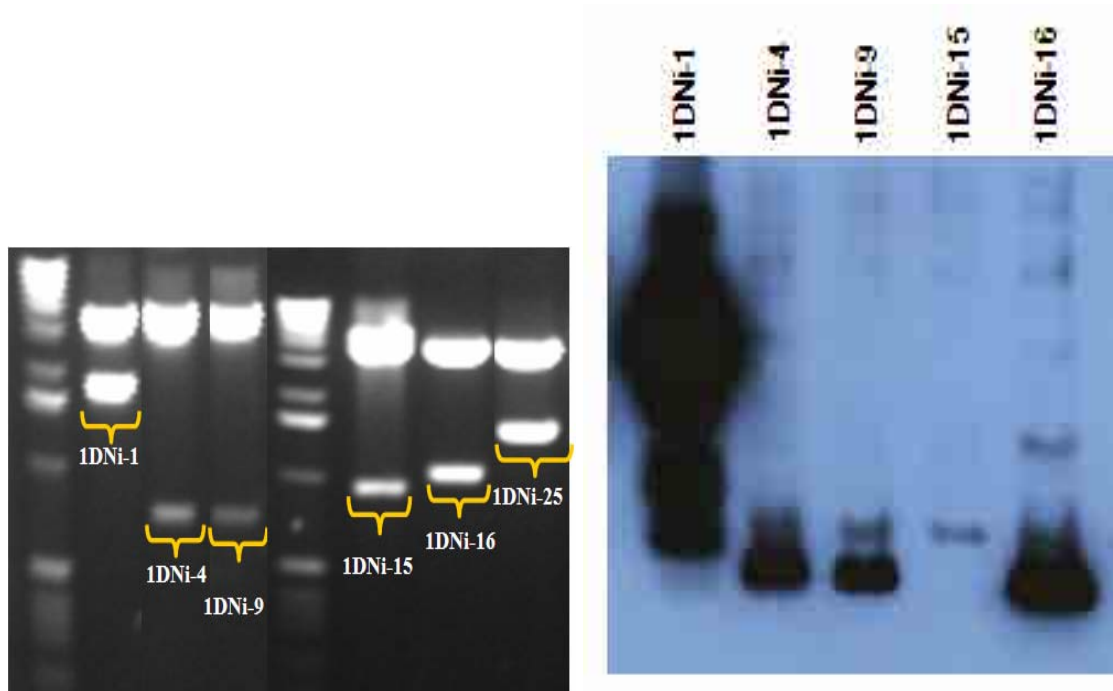


Fig. 20. Subclonación y expresión de las diferentes clonas. A la izquierda subclonación de los cDNAs correspondientes a las presas en el vector pCMV Myc, derecha se observa la expresión de algunas de las clonas en células HEK 293-T.

El  $\alpha_{1D}$ -AR fue clonado en el vector pCEFL con los diferentes epítipes HA o 3XFLAG y se observó su expresión en células HEK 293-T por técnicas de inmunofluorescencia. Se pudo comprobar la localización en su mayor parte a nivel intracelular, aunque también se expresó ligeramente en membrana (Fig. 21).



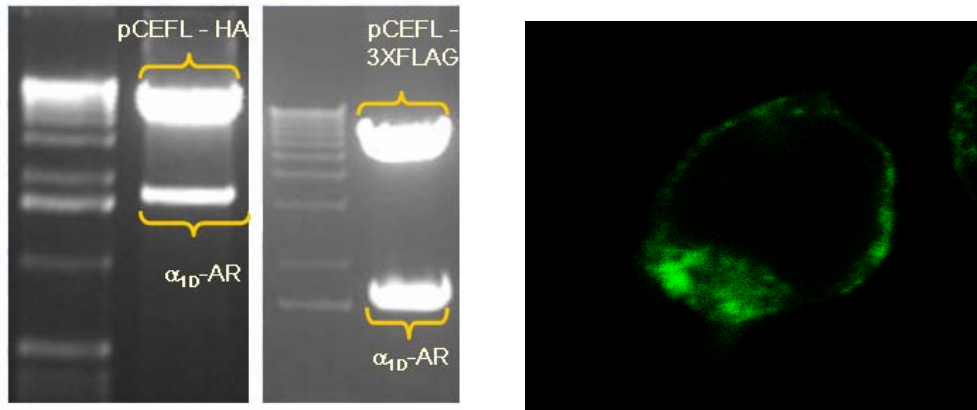


Fig. 21. Subclonación y expresión del receptor  $\alpha_{1D}$  adrenérgico. Izq., clonación del receptor en los vectores pCEFL HA y pCEFL 3xFLAG y der., localización intracelular del  $\alpha_{1D}$ -AR en células HEK 293-T.

Para evaluar el efecto de las diferentes clonas en la localización celular del receptor, se realizaron algunos experimentos de inmunofluorescencia cotransfectando los cDNAs del receptor y de algunas de las clonas aisladas. Se observó que una de las clonas modifica la localización de este receptor en células HEK 293-T (Fig. 22).

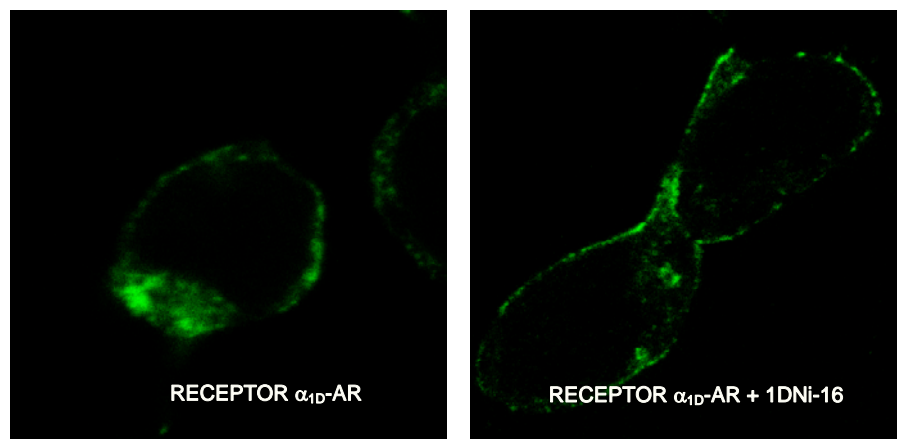


Fig. 22. Localización del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR al ser transfectado con la clona 1DNi-16. Izquierda, células HEK 293-T transfectadas solo con el receptor (control), izquierda células cotransfectadas con el receptor y la clona 1DNi-16.

## VI. Utilización de la técnica de fosfatos de inositol para evaluar el efecto de las clonas sobre la función del receptor.

Inicialmente se evaluó el efecto de NE sobre los receptores  $\alpha_{1D}$ -AR a diferentes tiempos de exposición al agonista, en este experimento se pudo determinar que el efecto máximo del agonista sobre la formación de fosfatos de inositol ocurre a partir de una incubación de 30 min utilizando 10  $\mu$ M de NE (Fig. 23).

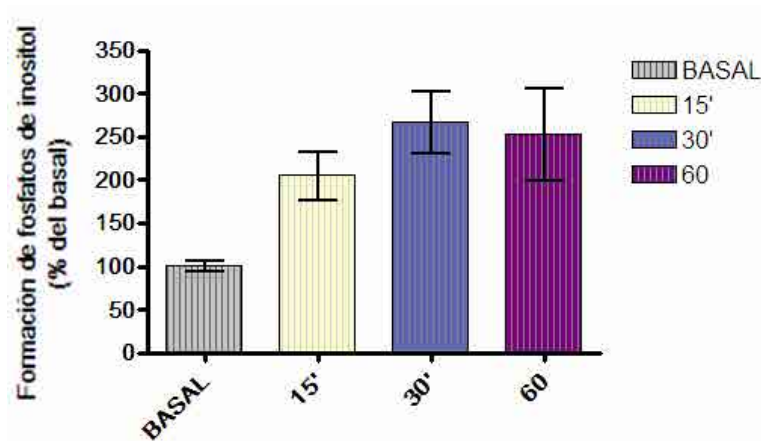


Fig. 23. Curso temporal de la activación del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR. Formación de fosfatos de inositol (en células HEK 293-T transfectadas con 4  $\mu$ g del receptor) a diferentes tiempos de la activación del receptor.

Los experimentos realizados para determinar la concentración mínima de receptor transfectado que permitiera observar un efecto claro sobre la formación de fosfatos de inositol, nos permitió determinar la concentración de 1  $\mu$ g de DNA del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR para los siguientes experimentos en células HEK 293-T (Fig. 24).

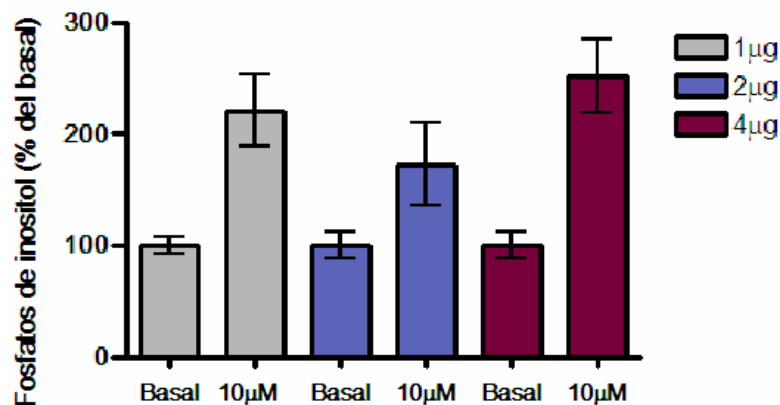


Fig. 24. Determinación de la concentración mínima de receptor en el efecto evocado por 10  $\mu$ M de NE en células HEK 293-T.

En los experimentos de cotransfección en células HEK 293-T con el receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  y algunas de las clonas aisladas del tamizaje con la librería de cDNAs de corazón, se pudo observar que la clona 1DNi-15 (proteína F-box 7) presenta un efecto claro al prevenir la activación del receptor y la clona 1DNi-25 (F-box 22) incluso disminuye la actividad del receptor por debajo de su nivel basal. Otras clonas como la 1DNi-9 no mostraron efecto sobre la formación de fosfatos de inositol al ser cotransfectadas con el receptor (Fig. 25).

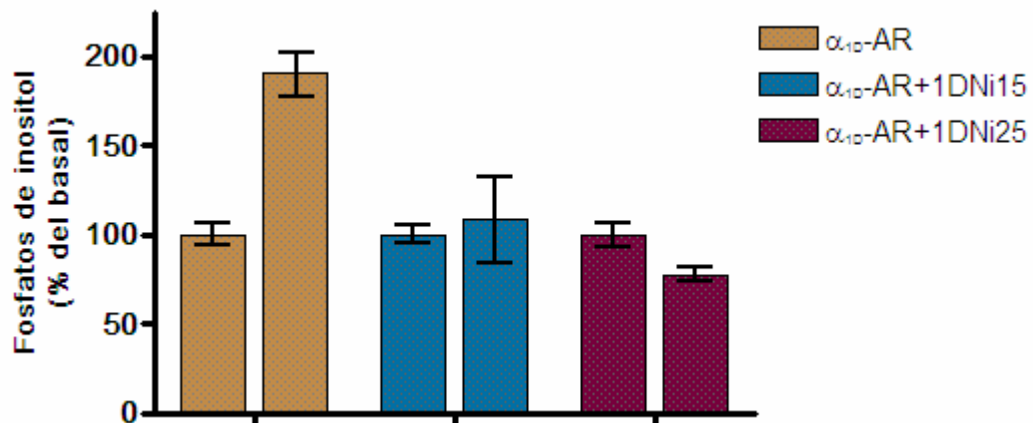


Fig. 25. Efecto de las clonas 1DNi-15 y 25 sobre la función del receptor  $\alpha_{1D}$  adrenérgico. Datos obtenidos de 3 experimentos independientes estimulando con 10  $\mu$ M de NE por 30min.

## Análisis de resultados:

La hipertensión se caracteriza por un incremento en la resistencia vascular periférica y la hiperreactividad de los vasos sanguíneos a estímulos vasoconstrictores, los receptores  $\alpha_{1D}$  adrenérgicos desempeñan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión (Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Tanoue *et al.*, 2002a), y se ha sugerido que estos receptores tienen una actividad constitutiva que podría estar participando en este proceso patológico (Gisbert *et al.*, 2000; Ziani *et al.*, 2002; Gisbert *et al.*, 2003; Garcia-Sainz y Villalobos-Molina, 2004).

Algunos estudios previos con otros receptores han demostrado que el dominio carboxilo terminal desempeña un papel importante en la regulación de su función al favorecer la internalización de estos receptores (Lattion *et al.*, 1994; Garcia-Sainz *et al.*, 1999) y por otro lado el dominio amino terminal regula la localización del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR (Hague *et al.*, 2004a). Sin embargo no se han reportado proteínas que al interactuar con el receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico regulen su función y/o modifiquen su localización, por lo tanto, en este estudio usando el sistema del doble híbrido en levadura, se aislaron proteínas provenientes de una librería de cDNAs de corazón humano que interactúan con los dominios N o C-terminal del  $\alpha_{1D}$ -AR y se determinó que algunas de estas proteínas modulan la localización y/o función del  $\alpha_{1D}$ -AR en células HEK 293-T.

El sistema del doble híbrido en levadura también permitió determinar la interacción específica de dos proteínas (prosaposina y AMSH) con la región C-terminal del  $\alpha_{1D}$ -AR, lo que sugiere la participación de estas proteínas como reguladores genéricos de la actividad de los GPCRs, ya que fueron originalmente clonadas con el carboxilo terminal del receptor sensor de calcio extracelular (Herrera-Vigener *et al.*, 2006).

Posterior al análisis informático de las secuencias de los cDNAs aislados del tamizaje, la identidad de las clonas no permitió vincular alguna directamente

como posible moduladora de la función o localización del receptor, debido a ello se procedió a evaluar el efecto de las diferentes clonas sobre el receptor. Utilizando las técnicas de inmunofluorescencia para monitorear la localización del receptor en células HEK 293-T y la cuantificación de fosfatos de inositol al estimular células con NE, se evaluó el efecto de las clonas al ser cotransfectadas con el receptor. Los resultados obtenidos con la última técnica nos permitieron enfocar nuestro interés en dos clonas 1DNI-15 y 25.

Como ya se ha reportado, se corroboró la localización mayoritariamente intracelular del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR en células HEK 293-T. Del efecto de las diferentes clonas sobre el receptor, se pudo observar que la clona 1DNI-16 parece aumentar su expresión a nivel de membrana, sin embargo es pertinente realizar más experimentos y utilizar como control el receptor truncado en la región N-terminal, para confirmar estas observaciones.

Los experimentos de formación de fosfatos de inositol permitieron evaluar el efecto de las clonas 1DNI-9, 15 y 25. Las dos últimas clonas previenen la formación de fosfatos de inositol, y en el caso de la clona 1DNI-25 parece disminuir el efecto incluso por debajo de los niveles basales, esto resulta muy interesante si se considera que este receptor se encuentra constitutivamente activo y que ésta característica parece vincularlo con la hipertensión arterial (Villalobos-Molina *et al.*, 1999). Es importante continuar la caracterización del efecto de estas clonas para determinar el mecanismo por el cual modulan la expresión del receptor y evaluar la localización del receptor al ser cotransfectado con ellas.

La cuantificación de fosfatos de inositol nos sugieren que la clona 1DNI-15 puede estar ejerciendo una actividad de antagonista sobre el receptor  $\alpha_{1D}$ . Esto nos permitiría, a reserva de comprobar la especificidad del efecto de esta clona sobre el  $\alpha_{1D}$ -AR, seguir caracterizando a nivel funcional estos receptores.

La clona 1DNI-25 parece incluso disminuir la actividad basal del receptor. Por lo tanto es necesario evaluar el efecto de esta clona sobre la actividad de los

otros receptores  $\alpha_1$ -AR, para determinar la especificidad de la interacción con el  $\alpha_{1D}$ -AR, así como el efecto sobre los otros subtipos en caso de presentarse.

Los péptidos (1DNI-15 y 1DNI-25), que demostraron la capacidad de inhibir la función del  $\alpha_{1D}$ -AR, tienen utilidad potencial para abundar en la caracterización de las propiedades farmacológicas este receptor. Estos péptidos pudieran actuar como agonistas inversos o antagonistas y tener una influencia en la afinidad del receptor por su ligando o bien en el número de receptores disponibles para ser estimulados. Para explorar estas posibilidades, sería importante extender la caracterización del efecto de estos péptidos en pruebas de unión de ligandos radiactivos, análisis de los procesos de desensibilización de estos receptores y determinar los efectos de los péptidos sintéticos en modelos animales normotensos e hipertensos. Además, sería importante determinar la especificidad de estos péptidos al comparar su efecto sobre otros receptores adrenérgicos.

En este trabajo se evidencia la importancia de estudiar a detalle las interacciones proteína-proteína y de desarrollar nuevos métodos para la detección de las mismas, ya que esto nos permitirá caracterizar en mayor detalle las vías señalización que participan en diferentes procesos patológicos y encontrar proteínas o péptidos que regulen la actividad de proteínas conocidas como potenciales blancos terapéuticos. Además, los péptidos que describimos pudieran ser la fuente para el desarrollo de ligandos del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR con utilidad terapéutica en las situaciones en las que alteraciones en la función de estos receptores se han asociados con enfermedad, como es el caso de la hipertensión.

## Conclusiones:

En el presente trabajo fue posible clonar los dominios amino y carboxilo terminal del  $\alpha_{1D}$ -AR en el vector pGB3.

Se determinó la factibilidad de usar el sistema de doble híbrido en levaduras, para identificar interacciones específicas entre las regiones amino y carboxilo terminal del  $\alpha_{1D}$ -AR con proteínas codificadas por una librería de cDNA de corazón.

El sistema del doble híbrido nos permitió aislar 7 clonas que codifican para proteínas con afinidad por el dominio amino terminal del receptor adrenergico  $\alpha_{1D}$  y verificar la interacción de dos proteínas, aisladas en un tamizaje con el dominio C-terminal del receptor sensor de calcio, con la región carboxilo terminal del  $\alpha_{1D}$ -AR.

Entre los cDNAs aislados del tamizaje con la librería de corazón, dos que codifican para proteínas F-Box 7 y 22 fueron capaces de prevenir la formación de fosfatos de inositol al estimular con norepinefrina receptores  $\alpha_{1D}$ -AR en células HEK 293-T.

## Perspectivas:

- Los péptidos derivados de las secuencias 1DNI-15 y 25 pudieran actuar como agonistas inversos o antagonistas al modificar la función del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR, esto se podría evaluar en pruebas funcionales en sistemas modelo en que los péptidos se agregaran de manera exógena. Además sería importante evaluar su efecto sobre la afinidad del receptor por su ligando y el número de receptores disponibles para ser estimulados.
- La actividad de los péptidos sintéticos pudiera tener alguna aplicación farmacológica en procesos donde la sobreexpresión, activación o alteración de los receptores  $\alpha_{1D}$ -AR esta vinculada con eventos patológicos como la hipertensión. Esto podría ser evaluado en animales modelo de ratas hipertensas.



## Bibliografía:

- Bockaert, J. y J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *Embo J* **18**(7): 1723-1729.
- Brede, M., M. Philipp, A. Knaus, V. Muthig y L. Hein (2004). "alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models." *Biol Cell* **96**(5): 343-348.
- Collins, S., W. Cao y J. Robidoux (2004). "Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism." *Mol Endocrinol* **18**(9): 2123-2131.
- Cooper, G. M. R. E. H. (2004). *The cell, a molecular approach*. Washington D.C., U. S., ASM press: 541-589.
- Chalothorn, D., D. F. McCune, S. E. Edelmann, M. L. Garcia-Cazarin, G. Tsujimoto y M. T. Piascik (2002). "Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes." *Mol Pharmacol* **61**(5): 1008-1016.
- Chalothorn, D., D. F. McCune, S. E. Edelmann, K. Tobita, B. B. Keller, R. D. Lasley, D. M. Perez, A. Tanoue, G. Tsujimoto, G. R. Post y M. T. Piascik (2003). "Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha 1B- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes." *J Pharmacol Exp Ther* **305**(3): 1045-1053.
- Diviani, D., A. L. Lattion, L. Abuin, O. Staub y S. Cotecchia (2003). "The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis." *J Biol Chem* **278**(21): 19331-19340.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold y M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7413-7417.
- Finch, A. M. y R. M. Graham (2006). "The alpha(1D)-adrenergic receptor: cinderella or ugly stepsister." *Mol Pharmacol* **69**(1): 1-4.
- Flordellis, C., H. Paris, A. Karabinis y A. Lymperopoulos (2004). "Pharmacogenomics of adrenoceptors." *Pharmacogenomics* **5**(7): 803-817.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J. P. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding y A. J. Harmar (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." *Pharmacol Rev* **57**(2): 279-288.

- Garcia-Sainz, J. A., J. Vazquez-Prado y L. del Carmen Medina (2000). "Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation." *Eur J Pharmacol* **389**(1): 1-12.
- Garcia-Sainz, J. A., J. Vazquez-Prado y R. Villalobos-Molina (1999). "Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease." *Arch Med Res* **30**(6): 449-458.
- Garcia-Sainz, J. A. y R. Villalobos-Molina (2004). "The elusive alpha(1D)-adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles." *Eur J Pharmacol* **500**(1-3): 113-120.
- Gisbert, R., M. A. Noguera, M. D. Ivorra y P. D'Ocon (2000). "Functional evidence of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in rat aorta." *J Pharmacol Exp Ther* **295**(2): 810-817.
- Gisbert, R., F. Perez-Vizcaino, A. L. Cogolludo, M. A. Noguera, M. D. Ivorra, J. Tamargo y P. D'Ocon (2003). "Cytosolic Ca<sup>2+</sup> and phosphoinositide hydrolysis linked to constitutively active alpha 1D-adrenoceptors in vascular smooth muscle." *J Pharmacol Exp Ther* **305**(3): 1006-1014.
- Hague, C., Z. Chen, A. S. Pupo, N. A. Schulte, M. L. Toews y K. P. Minneman (2004a). "The N terminus of the human alpha1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression." *J Pharmacol Exp Ther* **309**(1): 388-397.
- Hague, C., M. A. Uberti, Z. Chen, R. A. Hall y K. P. Minneman (2004b). "Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors." *J Biol Chem* **279**(15): 15541-15549.
- Herrera-Vigenor, F., R. Hernandez-Garcia, M. Valadez-Sanchez, J. Vazquez-Prado y G. Reyes-Cruz (2006). "AMSH regulates calcium-sensing receptor signaling through direct interactions." *Biochem Biophys Res Commun* **347**(4): 924-930.
- Hrometz, S. L., S. E. Edelmann, D. F. McCune, J. R. Olges, R. W. Hadley, D. M. Perez y M. T. Piascik (1999). "Expression of multiple alpha1-adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction." *J Pharmacol Exp Ther* **290**(1): 452-463.
- Hu, L. A., W. Chen, N. P. Martin, E. J. Whalen, R. T. Premont y R. J. Lefkowitz (2003). "GIPC interacts with the beta1-adrenergic receptor and regulates beta1-adrenergic receptor-mediated ERK activation." *J Biol Chem* **278**(28): 26295-26301.
- Karp, G. (2002). *Cell and molecular biology, concepts and experiments*. John Wiley & Sons. New York, U. S.

- Koch, W. J. (2004). "Genetic and phenotypic targeting of beta-adrenergic signaling in heart failure." *Mol Cell Biochem* **263**(1-2): 5-9.
- Lattion, A. L., D. Diviani y S. Cotecchia (1994). "Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor." *J Biol Chem* **269**(36): 22887-22893.
- Lefkowitz, R. J. (2004). "Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors." *Trends Pharmacol Sci* **25**(8): 413-422.
- Lomasney, J. W., S. Cotecchia, W. Lorenz, W. Y. Leung, D. A. Schwinn, T. L. Yang-Feng, M. Brownstein, R. J. Lefkowitz y M. G. Caron (1991). "Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5." *J Biol Chem* **266**(10): 6365-6369.
- McGraw, D. W. y S. B. Liggett (2005). "Molecular mechanisms of beta2-adrenergic receptor function and regulation." *Proc Am Thorac Soc* **2**(4): 292-296; discussion 311-292.
- Micklos, D. A. F., G. A. & D. A. Crotty (2003). *DNA Science, a first course*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, U. S. 575.
- Mier, K., D. Kemken, H. A. Katus, G. Richardt y T. Kurz (2002). "Adrenergic activation of cardiac phospholipase D: role of alpha(1)-adrenoceptor subtypes." *Cardiovasc Res* **54**(1): 133-139.
- Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling." *Prog Biophys Mol Biol* **83**(2): 101-130.
- Perez, D. M., M. T. Piascik y R. M. Graham (1991). "Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA." *Mol Pharmacol* **40**(6): 876-883.
- Piascik, M. T. y D. M. Perez (2001). "Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions." *J Pharmacol Exp Ther* **298**(2): 403-410.
- Piascik, M. T., M. S. Smith, E. E. Soltis y D. M. Perez (1994). "Identification of the mRNA for the novel alpha 1D-adrenoceptor and two other alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle." *Mol Pharmacol* **46**(1): 30-40.
- Pollard, D. T. W. A. E. (2004). *Cell Biology*. Saunders and Imprint of Elsevier Science.
- Pupo, A. S., M. A. Uberti y K. P. Minneman (2003). "N-terminal truncation of human alpha1D-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein." *Eur J Pharmacol* **462**(1-3): 1-8.

- Schwinn, D. A., J. W. Lomasney, W. Lorenz, P. J. Szklut, R. T. Fremeau, Jr., T. L. Yang-Feng, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz y S. Cotecchia (1990). "Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype." *J Biol Chem* **265**(14): 8183-8189.
- Tanoue, A., M. Koba, S. Miyawaki, T. A. Koshimizu, C. Hosoda, S. Oshikawa y G. Tsujimoto (2002a). "Role of the alpha1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension." *Hypertension* **40**(1): 101-106.
- Tanoue, A., Y. Nasa, T. Koshimizu, H. Shinoura, S. Oshikawa, T. Kawai, S. Sunada, S. Takeo y G. Tsujimoto (2002b). "The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction." *J Clin Invest* **109**(6): 765-775.
- Turnbull, L., D. T. McCloskey, T. D. O'Connell, P. C. Simpson y A. J. Baker (2003). "Alpha 1-adrenergic receptor responses in alpha 1AB-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(4): H1104-1109.
- Vazquez-Prado, J., J. Basile y J. S. Gutkind (2004). Modular architecture and novel protein-protein interactions regulating the RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors. Methods Enzymol. **390**: 259-285.
- Vazquez-Prado, J., P. Casas-Gonzalez y J. A. Garcia-Sainz (2003). "G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions." *Cell Signal* **15**(6): 549-557.
- Vazquez-Prado, J. y J. A. Garcia-Sainz (1996). "Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes." *Mol Pharmacol* **50**(1): 17-22.
- Villalobos-Molina, R., J. J. Lopez-Guerrero y M. Ibarra (1999). "Functional evidence of alpha1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats." *Br J Pharmacol* **126**(7): 1534-1536.
- Zhang, T., Q. Xu, F. R. Chen, Q. D. Han y Y. Y. Zhang (2004). "Yeast two-hybrid screening for proteins that interact with alpha1-adrenergic receptors." *Acta Pharmacol Sin* **25**(11): 1471-1478.
- Ziani, K., R. Gisbert, M. A. Noguera, M. D. Ivorra y P. D'Ocon (2002). "Modulatory role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in conductance arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(2): H475-481.

<http://www.hprd.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

<http://smart.embl-heidelberg.de>