

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Fisiología Celular

Doctorado en Ciencias Biomédicas

TESIS

“Desensibilización del receptor α_{1D} adrenérgico humano”

Para obtener el grado en Doctor en Ciencias presenta:

Citlali Ekaterina Rodríguez Pérez

Director de Tesis:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto de investigación fue apoyado por los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (79908) y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA (IN212609). La alumna recibió beca de la Coordinación de Estudios de Posgrado, CEP por el período comprendido del 1° de febrero de 2009 al 31 de Junio de 2009.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

forjadora de espíritus libres

Al Instituto de Fisiología Celular

por permitirme hacer Ciencia.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas

por su formación académica.

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz por su dirección, apoyo, entusiasmo, y por tenerme la confianza para desarrollar este proyecto.

A los integrantes del Comité Tutoral, por sus valiosas asesorías y participación en el desarrollo del proyecto:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, Dra. Marina Macías Silva, Dra. Guadalupe Reyes Cruz y Dra. Ma. Teresa Romero Ávila.

Al Comité de Examen por sus comentarios y revisión de la tesis:

Dra. Ma. Cristina Fernández Mejía, Dra. Marina Macías Silva, Dr. Juan Pablo Méndez Blanco, Dra. Erika Rendón Huerta y Dr. Rafael Villalobos Molina.

Por la lectura y observaciones a la tesis:

Dra. Luz del Carmen Medina y Dra. Ma. Teresa Romero Ávila.

A la Unidad de Biología Molecular del IFC, por su apoyo en la generación de oligos y secuenciación así como por asesorías.

Dra. Laura Ongay Larios, M.C. Minerva Mora Cabrera y a Guadalupe Códiz Códiz.

Al Dr. Héctor Malagón y Dra. Claudia Rivera del Bioterio del IFC por su ayuda en la generación de anticuerpos.

A la Dra. Marina Macías Silva y Dr. José Vázquez Prado por sus indicaciones en el montaje de la metodología de fosfoaminoácidos.

Itzell Ortiz Gallardo por su asesoramiento en la obtención de células endoteliales.

A la Dra. Araceli Patrón y Gabriel Orozco Hoyuela, de la Unidad Microscopía del IFC

Al Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo e Ing. Ivette Rosas Arciniega de Cómputo del IFC.

A Guadalupe Ramírez, Dominga y Rosario Villaseñor.

A los Coordinadores del Programa en Ciencias Biomédicas.

Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dr. Federico Martínez Montes y Dr. Javier Espinosa Aguirre.

Al Dr. Mario Calcagno Montans, a la Dra. Alicia González y a la Dra. Marcia Hiriart

A Sara Noguera

Al personal de la biblioteca del IFC

Al Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo e Ing. Ivette Rosas Arciniega de Cómputo del IFC.

A Alicia Sampieri García, a Valentín Mendoza y a Héctor Rincón Arano por su ayuda, amistad y solidaridad en momentos difíciles.

A mis profesores durante el Doctorado: Dr. Carlos Céspedes, Dra. Ma. Eugenia Torres, Dr. Roberto Coria, Dra. Patricia Ostrosky, dentro de está larga lista.

Y por último a mis compañeros de laboratorio, Tere Romero, Guadalupe Jiménez, Rocío Alcantará, Tzindilú Molina, Aleida Vázquez, Bety Aguilar, Aliesha González, Eréndira Avendaño, Christian Colin, Aurelio Méndez, Jean Castillo, Alejandro Cabrera, Maria José Jiménez, Katia Kalashnikova, Itzel Escobedo, Diana Tapia, Hugo y Javier.

A todo aquel que sin querer omito.

DEDICATORIA

*¡Hay hombres que luchan un día
y son buenos, otros luchan un año
y son mejores, hay quienes luchan
muchos años y son muy buenos,
pero están los que luchan toda
la vida, y esos son los
imprescindibles!*
Bertolt Brecht

*¡Caminante, son tus huellas el camino, y nada más;
caminante, no hay camino, se hace camino al andar
Al andar se hace camino, y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar
Caminante, no hay camino, sino estelas en la mar!*
Antonio Machado

A todos aquellos que me quieren y han confiado en mí.

A mi mamá Elba

A mis hermanos Yuri y Quetzalcoatl

A Andrei Mitchel

A mis amigos en las diferentes etapas de mi vida

Sí no conozco una cosa, la investigaré.
Louis Pasteur

*Todo aquello que un hombre puede imaginar,
otros lo podrán realizar.*
Jolius Verne

Imposible es el adjetivo de los imbéciles
Napoleón Bonaparte

NO PARES

Nadie puede pisotear tu libertad
Grita fuerte por si te quieren callar
Nada puede detenerte, si tú tienes fe
No te quedes con tú nombre escrito en la pared
En la pared

Si censuran tus ideas, ten valor
No te rindas nunca, siempre alza la voz
Lucha fuerte sin medida, no dejes de creer
No te quedes con tú nombre escrito en la pared
En la pared

No Pares
No pares, no
No pares nunca de soñar
No pares
No pares, no
No pares nunca de soñar
No tengas miedo a volar
Vive tu vida

No Pares
No pares, no
No pares nunca de soñar
No pares
No pares, no
No pares nunca de soñar
No tengas miedo a volar
Vive tu vida

No construyas muros en tu corazón (en tú corazón)
Lo que hagas, siempre hazlo con amor (con amor)
Pon las alas contra el viento, no hay nada que perder
No te quedes con tu nombre escrito en la pared
Noooooooo

No Pares
No pares, no
No pares nunca de soñar
No pares
No pares, no
No pares nunca de soñar
No tengas miedo a volar
Vive tu vida

No Pares
No pares, no
No pares nunca de soñar
No pares
No pares, no
No pares nunca de soñar
No tengas miedo a volar
Vive tu vida

No pares nunca de soñar

Vive Tú Vida

ÍNDICE

RESUMEN

I.-Introducción.....	1-2
II.-Marco teórico-conceptual.....	3-28
II.1-Comunicación celular.....	3-4
II.2-Receptores celulares.....	4-5
II.3-Receptores Membranales.....	5-12
II.3.1-Receptores acoplados a proteínas G.....	5-7
II.3.1.1-Proteínas G.....	8-10
II.3.2-Receptores con actividad de tirosina cinasa.....	11-12
II.4-Las catecolaminas.....	13-16
II.4.1-Síntesis y almacenamiento.....	13
II.4.2-Funciones fisiológicas.....	13-14
II.5-Los receptores adrenérgicos.....	15-28
II.5.1-Generalidades.....	15
II.5.2-Estructura.....	15-17
II.5.3-Farmacología.....	18-19
II.5.4-Mecanismos de Señalización.....	19-20
II.5.-Regulación.....	21
II.5.1-Fosforilación y Desensibilización.....	22-24
II.5.2-Internalización.....	24-25
II.5.3-Reciclaje y Degradación.....	25-26
II.5.4-Interacciones intermoleculares.....	27-28
II.5.4.1.-Oligomerización entre receptores.....	27-28
III.-Antecedentes.....	29-30
IV.- Justificación.....	31
V.- Hipótesis.....	31
VI.-Objetivos.....	32
VII.-Material.....	33
VIII.-Metodología.....	34-46
IX.-Resultados.....	47-59
X.-Discusión.....	60-64
XI.-Conclusión.....	65
XII.-Bibliografía.....	66-75
Anexos I-VII	

ABREVIATURAS

BK---Bradicinina
BMY7378--- (8-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-8-azaspiro[4,5]decano-7,9
dineodocloruro
DAG—Diacilglicerol
EGF—Factor de Crecimiento Epidérmico
ET---Endotelina
GPCRs--- Receptores Acoplados a Proteínas G
GRK—Cinasa de los GPCRs
HA---Hematoglutinina
IGF---Factor de Crecimiento similar a la Insulina
INS---Insulina
IP3----Fosfato de Inositol 3
LPA---Ácido Lisofosfatídico
NA----Noradrenalina
PDGF----Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PKC---Proteína Cinasa C
PLC---Fosfolipasa C
RA----Receptor Adrenérgico
RTK—Receptores con actividad de Tirosina Cinasa
S1P---Esfingosina 1 Fosfato
TPA—tetradecanoil forbol éster
NΔ---forma trunca del receptor sin los primeros 79 aminoácidos del amino terminal.
NΔΔC--- forma trunca del receptor sin los primeros 79 aminoácidos del amino terminal y
sin los últimos 149 del extremo carboxilo terminal

R E S U M E N

En esta tesis se estudió el papel que tiene la desensibilización en la regulación del receptor α_{1D} adrenérgico humano. Éste receptor es un subtipo de los receptores α_1 adrenérgicos que forman parte de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G. El receptor adrenérgico α_{1D} se caracteriza por tener actividad constitutiva y una expresión reducida en la membrana plasmática, además de tener un papel fisiológico fundamental.

La información estructural de los dominios que determinan la función y señalización de este subtipo es escasa, por lo que se decidió estudiar el papel de la región del carboxilo terminal del receptor en estos procesos, para lo cual se estudió el receptor truncado en el amino y carboxilo terminal ($\Delta 1-79$ y $\Delta 441-572$, ($\Delta N-\Delta C$)) y fue comparado con el receptor truncado en el amino terminal ($\Delta 1-79$, (ΔN)). Estos receptores trancos fueron establemente expresados en los fibroblastos Rat-1, también fueron detectados por fotomarcaje y estudios de unión a ligando y mostraron una actividad intrínseca, aumentada por la noradrenalina en la liberación de calcio intracelular y la producción de fosfatos de inositol. La activación de la proteína cinasa C atenuó la función de ambos receptores α_{1D} ΔN y $\Delta N-\Delta C$; por estudios de marcaje metabólico con fosfato radiactivo y la inmuprecipitación del receptor indicaron que son fosfoproteínas, cuyo estado basal de fosforilación incrementa por la noradrenalina y esteres de forbol. Además estos receptores fueron desensibilizados por la activación de otros receptores presentes en la célula. Los resultados de esta investigación demuestran que la región del carboxilo terminal del receptor no es esencial en su actividad señalizante ni en la desensibilización del receptor α_{1D} adrenérgico humano.

“Desensibilización del receptor α_{1D} adrenérgico humano”

I.-INTRODUCCIÓN

Los receptores adrenérgicos forman parte de la gran familia de receptores acoplados a las proteínas G (GPCRs) o de siete dominios transmembranales. Estos receptores tienen un papel fundamental en la regulación fisiológica, mediando las acciones de la adrenalina y la noradrenalina. En el genoma humano existen tres familias de receptores adrenérgicos: α_1 , α_2 y β , y cada una presenta tres subtipos codificados por genes diferentes: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} ; α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} ; β_1 , β_2 y β_3 (Hieble, 1995). Esta clasificación se ha corroborado por estudios farmacológicos, bioquímicos y moleculares. La distribución de estos subtipos es diferente en los tejidos y varía entre las especies.

El estudio del receptor α_{1D} adrenérgico (RA- α_{1D}) tiene una gran relevancia, debido a que participa en procesos fisiológicos como la presión arterial y la contracción muscular, así como en la fisiopatología de la hipertensión (Gisbert, 2000, 2002; Piascik, 1995; Tanoue, 2002), una enfermedad que tiene una alta incidencia en la población. A pesar de ello, el avance en el conocimiento del receptor α_{1D} ha sido lento y complicado por la falta de fármacos selectivos (agonistas), la carencia de anticuerpos específicos para el receptor, además de presentar un acoplamiento menor a la vía de señalización en comparación a los otros subtipos de RA. Esto último se debe a su localización, predominantemente en vesículas intracelulares y tan sólo una pequeña población en la membrana plasmática (Chalothorn et al, 2002; McCune et al, 2000). Se ha reportado que la eliminación de los 79 aminoácidos del extremo amino terminal del receptor aumenta la densidad de RA- α_{1D} en la membrana plasmática, lo cual sugiere que esta secuencia regula su localización (Pupo, 2003; Hague, 2004). También se ha observado que puede formar heterodímeros con los

receptores α_{1B} y β_2 adrenérgicos, lo cual promueve que se movilice hacia la membrana y que se modifique su comportamiento farmacológico (Hague et al, 2004, 2006).

La función de los receptores α_1 adrenérgicos es regulada por diferentes mecanismos moleculares, uno de los más importantes es la fosforilación, ya que modula su sensibilidad a las catecolaminas y su respuesta celular. La fosforilación es considerada como el primer paso de la desensibilización (pérdida de la función o apagado de la señal). Los receptores α_1 adrenérgicos son regulados diferencialmente por la fosforilación mediada por diferentes cinasas, entre ellas la proteína cinasa C (PKC).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que el RA- α_{1D} es una fosfoproteína, cuyo estado de fosforilación se asocia a la desensibilización homóloga (dependiente del agonista) y a la heteróloga (independiente del agonista) (García-Sáinz et al, 2001, 2004; Rodríguez-Pérez et al, 2009). Sin embargo, no existe información de los dominios estructurales que determinan la función y regulación de este subtipo. Por tal motivo, decidimos abordar este aspecto, generando dos líneas celulares que expresan establemente dos formas truncas del RA- α_{1D} humano: 1) en una de ellas se eliminó los primeros 79 aminoácidos de la región amino terminal, llamada ΔN ; y 2) sin las regiones amino y carboxilo terminal denominada ΔC - ΔN . La construcción ΔN fue utilizada como una herramienta auxiliar o control, para compararlo con el RA- α_{1D} carente del carboxilo terminal, y así determinar si esta región es esencial para la regulación, debido a que contiene múltiples sitios probables de fosforilación. Una vez generadas las construcciones truncas (ΔN y ΔN - ΔC) del receptor α_{1D} adrenérgico humano, fueron transfectados establemente en las células Rat-1, obteniéndose una alta expresión (2 pmol/mg de proteína membranal). Estas construcciones fueron analizadas por inmunoprecipitación y fotomarcaje. En ambas aumentó la actividad intrínseca al estimular con noradrenalina y se atenuó la capacidad para activar a la PKC, así como por la activación de otra familia de GPCRs y receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs). El marcaje con fosfato radiactivo indicó que el estado de fosforilación aumentó en presencia de noradrenalina y por la activación directa de la PKC con ésteres de forbol, en ambas formas truncas del receptor α_{1D} adrenérgico. Los resultados indican que el carboxilo terminal no es esencial para la actividad, fosforilación o desensibilización de este receptor.

II.-MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

II.1 Comunicación Celular

A lo largo de la evolución los organismos han desarrollado una compleja y eficiente red de comunicación celular, que les ha permitido sobrevivir, crecer y adaptarse a diferentes circunstancias o estímulos, manteniendo un estado de homeostasis con el entorno celular.

La comunicación entre las células puede llevarse a cabo directamente o a distancia, y es de varios tipos: endocrina u hormonal, en la cual las glándulas de secreción interna vierten la hormona al torrente sanguíneo en donde son transportadas a las células blanco; paracrina, la cual se produce entre células cercanas; autocrina, en la que el producto liberado por una célula actúa sobre la misma célula o células de la misma estirpe; sináptica o neurotransmisión, que ocurre en las células nerviosas donde la información va de una célula a otra a través del espacio sináptico; neuroendocrina, en donde una célula formada a partir de tejido nervioso secreta su mensajero a la circulación; y yuxtacrina, dada entre células adyacentes donde hay moléculas ancladas al lado externo de la superficie de una célula que hacen contacto con receptores localizados en la membrana de una célula contigua (Alberts, 2002; García-Sáinz, 1996)

Durante la comunicación celular existe un intercambio de información del exterior al interior de la célula, a través de cascadas de señalización secuenciales que propagan el mensaje para desembocar en una respuesta biológica integral.

La célula emplea diferentes mecanismos de señalización para mantener y coordinar íntegramente su función, para lo cual procesa y transfiere información de sus alrededores, en una sucesión de eventos moleculares. En esta transmisión de las señales participan diversos mensajeros químicos, al presentarse algún cambio extracelular. Los primeros en actuar son conocidos como mensajeros primarios (hormonas, neurotransmisores, autocoides, etc.). Estos mensajeros son de diferente naturaleza química (lipídica, peptídica o de amina) y viajan por el organismo para desencadenar una serie de eventos intracelulares, a través de la activación de receptores u “oídos celulares”, los cuales son moléculas sensoras que reciben, detectan y pasan el mensaje al interior de la célula. Después de la interacción del mensaje con el receptor se activan proteínas efectoras que generan o movilizan a los segundos mensajeros –

moléculas intermediarias- que activan otro grupo de proteínas y cambios en la expresión de genes, produciéndose así una amplificación de la señal que culminará en una determinada respuesta celular. Finalmente el ligando se disocia reversiblemente prosiguiendo a la inactivación o degradación. (Alberts et al, 2002; García-Sáinz, 1996; Norman y Litwack, 1997; Downword, 2001).

II.2 Receptores Celulares

El reconocimiento de un mensaje bioquímico en una célula es llevado a cabo por proteínas receptoras o receptores. El concepto de sustancia receptiva fue utilizado por vez primera por Langley alrededor de 1900, cuando investigaba las acciones del curare en el músculo esquelético. Desde entonces, quedó acuñado el término de receptor como una entidad física capaz de recibir y transmitir información de hormonas, neurotransmisores y fármacos para producirse una respuesta celular.

Los receptores pueden localizarse en el citosol o en la membrana plasmática y se clasifican en dos grandes grupos:

1) Los receptores intracelulares o citosólicos, cuyos ligandos son permeables a la membrana plasmática, tienen la particularidad de que una vez activados entran al núcleo y se unen al material genético por medio de sitios de reconocimiento al DNA. Entre ellos están los receptores al cortisol, a los glucocorticoides y mineralocorticoides, a las hormonas sexuales y tiroideas, a la vitamina D y a los retinoides.

2) Los receptores extracelulares o membranales, se agrupan en tres tipos de acuerdo a su forma de transmitir la señal:

-Receptores de siete dominios transmembranales, que interaccionan con proteínas G o GPCRs. Son activados por un grupo diverso de ligandos que incluyen hormonas, péptidos, aminoácidos, iones y fotones.

-Receptores con actividad enzimática, los cuales a su vez se subdividen de acuerdo al tipo de enzima involucrada en: a) con actividad de cinasa de tirosina (o RTKs), la mayoría de sus ligandos son factores de crecimiento (insulina, EGF, PDGF, etc.); b) con actividad de serina/treonina cinasa, como el del factor de crecimiento y transformación β (TGF- β); y c) con actividad de guanilil ciclase como el factor natriurético auricular (ANF).

-Receptores canal (o canales iónicos activados por ligando), que permiten el paso de iones a través de la membrana plasmática. A este tipo de receptores pertenecen los receptores del ácido γ -amino butírico (GABA) tipo A, los receptores para el N-Metil-D-aspartato (NMDA) y los de la glicina (Alberts et al, 2002; García-Sáinz, 1996).

II.3 Receptores Membranales

II.3.1- Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G son receptores transmembranales de la membrana celular. Esta familia de receptores es la más abundante en la naturaleza; intervienen en una gran gama de procesos fisiológicos (visión, olfacción, inmunidad, percepción sensorial, neurotransmisión y otros más). En el genoma humano se han detectado alrededor de mil genes que codifican para los GPCRs. Además se estima que aproximadamente el 50 por ciento de los fármacos de uso cotidiano en la medicina están dirigidos hacia ellos (Howard, 2001).

Los receptores pertenecientes a esta familia presentan una región amino terminal que es extracelular, una región carboxilo terminal intracelular y una región hidrofóbica integrada por siete dominios transmembranales de α -hélices, interconectados por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares que son hidrofílicas (Dixon, 1994). La mayoría de los GPCRs presenta un enlace disulfuro conservado entre dos cisteínas (en las asas extracelulares) probablemente para estabilizar la conformación del receptor. Las regiones extracelulares y transmembranales participan en la unión a ligando, mientras que la región intracelular es importante para la activación de las proteínas G y la regulación. En la Figura.1 se muestra la estructura del receptor de la rodopsina, como ejemplo de los GPCRs.

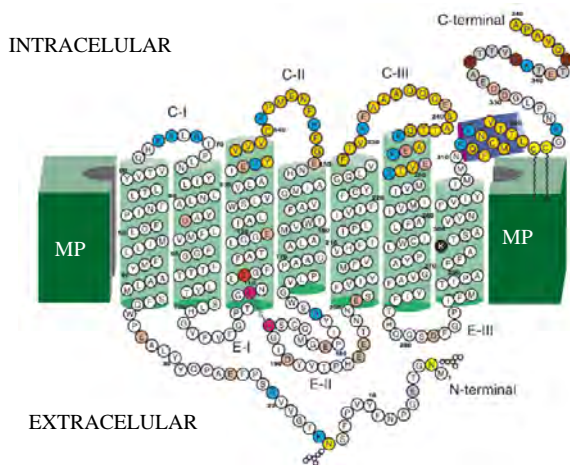
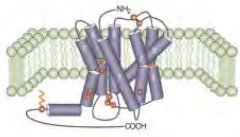
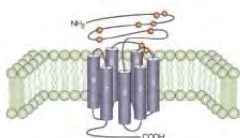
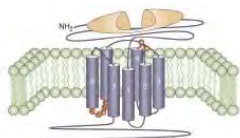


Figura 1.- Modelo estructural del GPCR: la Rodopsina. Regiones características: un C-terminal que es citosólico y un N-terminal que es extracelular; tres asas intracelulares (C-I, C-II y C-III); tres asas extracelulares (E-1, E-II y E-III). Los puentes disulfuro conservados en magenta; las cadenas de carbohidratos en Asn2 y Asn 15, dos grupos palmitoilados en Cys 322 y 323 en amarillo; en rojo residuos ácidos y en azul los básicos; El receptor se encuentra inmerso en la membrana plasmática, MP. (Teller et al, 2001).

Los GPCRs se han agrupado en diversas familias con base en la homología en la secuencia, estructura y propiedades funcionales. Se han propuesto varios sistemas de clasificación entre los que destacan: el sistema A-F (Kolakowski, 1994), el sistema 1 a 5 (Bockaer y Pin, 1999) y el sistema GRAFS (Fredriksson, 2003, 2005). Cada uno se encuentra integrado por las siguientes familias de receptores: de la Rodopsina (A o 1), de la Secretina (B o 2), de Adhesión (previamente incluido en B o 2), de Frizzled (F o 5) y del Glutamato (C o 3). Los primeros dos sistemas de clasificación cubren al repertorio completo, pero no incluyen a las familias recientemente descubiertas como en el último sistema (GRAFS), en las cuales los receptores se encuentran agrupados de acuerdo a la filogenia. La lista de GPCRs es actualizada cada seis meses y los reportes se publican en el sitio de internet (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd>) a través de la International Union of Pharmacology (IUPHAR) Receptor Database, entidad científica encargada de definir los criterios para la nomenclatura, clasificación y farmacología (Ford, 2005). En la Tabla I se destacan algunas características de cada familia.

Tabla I.- Características de las diversas familias de los GPCRs.

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN	FAMILIA (semejante a)	CARACTERÍSTICAS	LIGANDOS/RECEPTORES
<p>A, 1 o R</p> 	Rodopsina	<p>Es la familia de GPCRs más abundante. Entre sus características principales se encuentra un motivo NSxxNPxxY en el TMVII, y el motivo DRY o D(E)-R-Y(F) entre el TM III y el IL2. La mayoría presenta una cisteína palmitoilada en C-terminal.</p> <p>Sus ligandos son generalmente péptidos, cuya sitio de unión es el N-terminal, las asas extracelulares y la parte superior de los TMs. Tienen el dominio extracelular largo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Prostaglandinas; Aminas biogénicas (adrenérgicos, serotonina, dopamina, histamina, muscarínico); -Opsinas (del pigmento visual, opsinas, encefalopsinas, melanopsinas); melatonina; y MECA (melanocortina, de diferenciación endotelial, cannabinoides y adenosina). -Oxitocina, gonadotropina, tirotropina, vasopresina. -Somatostatina, opioides, neuropéptidos. -Quimiocinas, angiotensina y bradicinina. -Olfatorios, entre muchos más.
<p>B, 2 o S</p> 	Secretina	<p>Sus ligandos incluyen hormonas de alto peso molecular. Su N-terminal es largo y presenta varias cisteínas conservadas que son importante para la unión de sus ligandos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Secretina, calcitonina, glucagón, hormona paratiroidea,
<p>C, 3 o G</p> 	Glutamato	<p>El sitio de reconocimiento del ligando está situado en el N-terminal; presenta dos cisteínas en las asas extracelulares 1 y 2; la tercera asa intracelular es corta y altamente conservada.</p>	mGlu, GABA, gustativos tipo I
<p>B y 2, o S</p>	Adhesión	<p>Presentan dominios que participan en la adhesión. En el N-ter tiene sitios ricos en glicosilación, prolina y cisteínas.</p>	Latrotroxina, CD
<p>F, 5 o F</p>	“Frizzled”/Gustativo 2	<p>Presentan secuencias consenso: IFL en el TMII, SFLI en el TMV, y SxKTL en el TMVII. Los receptores gustativos tipo II se encuentran en la lengua y paladar, presentan un N-terminal corto. Los receptores Frizzled se encargan de controlar la proliferación, migración y destino celular mediante las señales de proteínas secretorias durante el desarrollo, conocidas como Wnts.</p>	FZD1-10, SMOH, TAS2R1-16

II.3.1.1. Proteínas G

Las proteínas G tienen actividad de GTPasa, por lo que requieren guanosin trifosfato (nucleótido de guanina) para su funcionamiento y se encuentran involucradas en distintas vías intracelulares. Entre los miembros de esta familia de proteínas se incluyen: 1) factores de iniciación y elongación en la síntesis de proteínas; 2) proteínas G monoméricas de bajo peso molecular (20-30 kDa) como Ras, Rho, Rab, Rac y Ran, que participan en el control de funciones celulares como la proliferación celular, el rearrreglo del citoesqueleto y/o el tránsito vesicular; y 3) proteínas G heterotriméricas encargadas de transducir las señales de los GPCRs.

Las proteínas G heterotriméricas están constituidas por tres subunidades: α de 45-47 kDa, β de 35 kDa y γ de 7-9 kDa. La subunidad α contiene dos dominios, uno involucrado en la unión e hidrólisis de GTP (dominio G), y otro dominio helicoidal que cubre al GTP en el centro de la proteína. La subunidad $G\alpha$ determina la especificidad del efector y se agrupa en cuatro subfamilias: G_q la que activa a la fosfolipasa C (PLC- β); G_s , media la estimulación de la adenilato ciclasa; G_i , que inhibe a la adenilato ciclasa y $G_{12/13}$ que activan proteínas G pequeñas. La subunidad β tiene una estructura provista de 7 láminas β -plegadas. La subunidad γ interactúa con la subunidad β a través de un espiral enrollado en su amino terminal y entonces toda la base de β hace contacto. Las subunidades $\beta\gamma$ forman una unidad funcional, que no es disociable excepto por desnaturalización (Hamm, 1998). El complejo $\beta\gamma$ es un modulador importante de varias isoformas de la PLC- β y de la adenilato ciclasa, efectores que regulan la concentración intracelular de segundos mensajeros (fosfatos de inositol y AMPc, entre otros) (Ford, 1998). Existen alrededor de 27 miembros de la subunidad α , 5 de la β y 14 de la γ que pueden formar distintas combinaciones funcionales (Fig 2).

La subunidad α presenta un sitio de ADP ribosilación dependiente de NAD^+ que es catalizado por las toxinas bacterianas, la toxina *Pertussis* (PTX) y la toxina del *Cólera* (CTX). Estas toxinas se han utilizado para identificar el tipo de proteína G: la G_s es ADP ribosilada por CTX, las G_i y G_o son ADP ribosiladas por PTX, y la G_t (o transducina), que participa en la respuesta a la luz en la retina, es ADP ribosilada por ambas toxinas (Melvin, 1991).

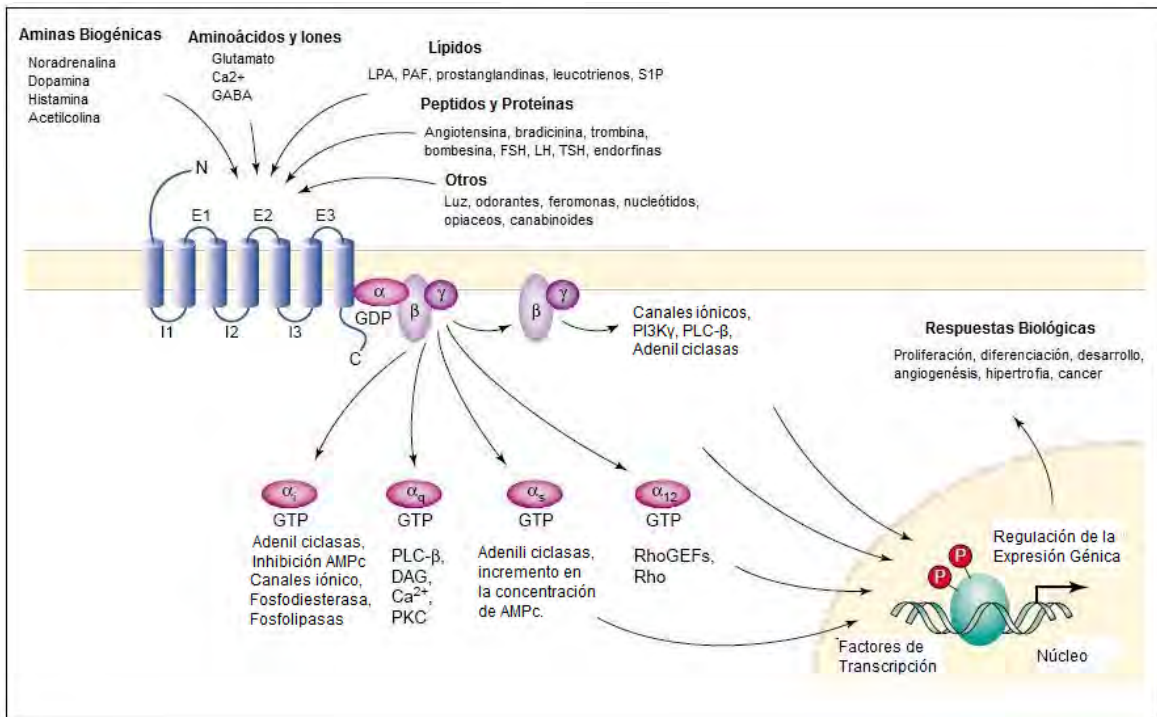


Figura 2.- Funciones de las proteínas G. Los GPCRs llevan a cabo su vía de señalización a través de su activación por un ligando propio de cada receptor y al acoplamiento a un subtipo de proteína G determinada que estimulará positivamente o negativamente a un efector, originándose así una respuesta biológica. (Marinissen y Gutkind, 2001)

La interacción de la proteína G con el receptor activado, promueve el intercambio de GDP unido a la subunidad α por GTP y la disociación subsecuente del complejo α -GTP del heterodímero $\beta\gamma$. La terminación de la señal ocurre cuando el GTP unido a la subunidad α es hidrolizado a GDP, y la subunidad α se reasocia al complejo $\beta\gamma$, lo que inicia un nuevo ciclo. La cinética de este ciclo es regulada por receptores, efectores, proteínas regulatorias o los reguladores de la señalización de la proteína G (RGS), las cuales aceleran o desaceleran la velocidad, mediante la actividad GTPasa, de la señalización a través del ciclo de la proteína G (Helper y Gilman, 1992; Neer, 1995) (Fig. 3). Un solo receptor puede activar múltiples moléculas de proteína G, amplificando el evento de unión del ligando. A pesar de tener funciones individuales, todas las proteínas G operan por el mismo mecanismo básico.

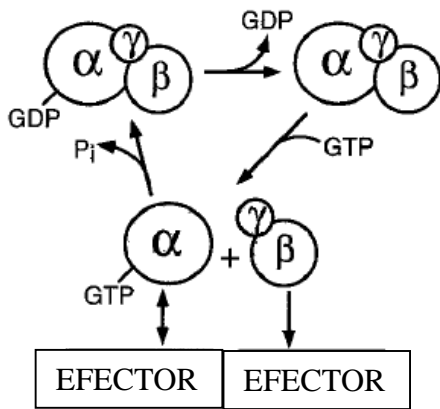


Figura 3.-Ciclo de activación e inactivación de las proteínas G. La proteína G fluye entre dos estados: 1) activo, cuando se encuentra disociado en $\beta\gamma$ y α unida a GTP, o 2) inactivo, asociado en un heterotrimerico donde α está unida al GDP. (Gilman, 1987; Neer, 1995)

II.3.2. Receptores con actividad de cinasa de tirosina

Los receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs) son proteínas integrales de la membrana plasmática. La mayoría de los RTKs consisten de una sola cadena polipeptídica, pero en el caso de los receptores de la insulina y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), presentan una estructura heterotetramérica. Existen alrededor de 60 RTKs, que incluyen receptores a diferentes factores de crecimiento, entre ellos: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), las efrinas, la insulina entre muchos más (Hubbard, 2007).

La estructura general se puede dividir en tres segmentos: 1) región extracelular; 2) región transmembranal y 3) región intracelular o señalizante. La región intracelular se divide en tres porciones: 1) dominio yuxtamembranal, 2) dominio con actividad de tirosina cinasa que es altamente conservado y 3) dominio carboxilo terminal. Los receptores de la insulina y del IGF están compuestos de dos subunidades con dominios extracelulares, conectados por puentes disulfuro, dos subunidades que atraviesan la membrana, y los dominios intracelulares de las dos cadenas (Fig. 4).

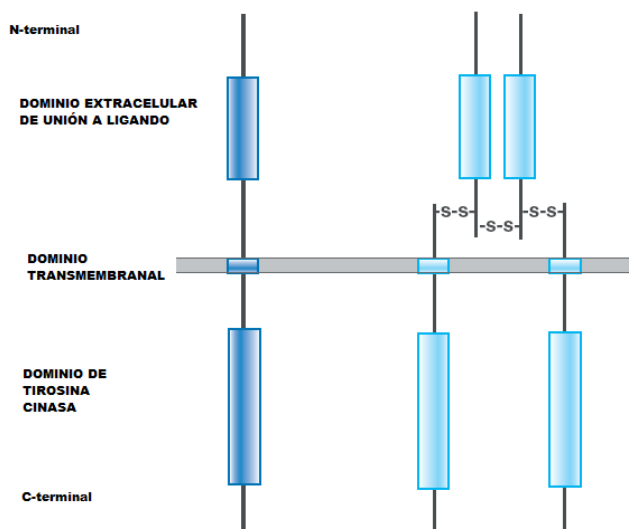


Figura 4.- Estructura de los RTKs.

Las estructuras de los RTKs monomérica (izquierda) y heterotetramérica (derecha). Esta última consiste de dos dímeros idénticos unidos por puentes disulfuro que forman el tetrámero $\alpha_2\beta_2$. (Tomado de Hupfeld y Olefsky, 2007)

Existe una gran variedad de ligandos para los RTKs que se fijan en el dominio extracelular, provocando un cambio conformacional y su activación, que inicia la señalización intracelular. La unión del ligando induce la dimerización del receptor promoviendo la yuxtaposición de los dominios citoplásmicos, lo que facilita la transfosforilación de las tirosinas por la activación del dominio de cinasas de tirosina. La fosforilación también puede ocurrir en otras fosfotirosinas dentro región citoplásmica pero fuera del dominio cinasa. Estas fosfotirosinas forman sitios para el reconocimiento y reclutamiento de proteínas adaptadoras (Grb2, Shc) que participan en cascadas de señalización intracelulares, a través de sus dominios conservados, SH2 (región de homología a Src) y PTB (regiones de unión a fosfotirosina), estos consisten de secuencias cortas de aminoácidos p-Yxxø y NPxp-Y, respectivamente. Estos dominios a través del reconocimiento específico de determinadas fosfotirosinas, permiten a las proteínas de las que forman parte la unión a los RTKs activados y a otras proteínas intracelulares que hayan sido a su vez fosforiladas en residuos de tirosina (Schlessinger, 2007).

El repertorio de los diferentes dominios y proteínas celulares que se unen a los RTKs, determinan las vías de señalización que son activadas por ellos. Las principales cascadas de señalización, activadas por estos receptores, son la vía de proteína cinasa activada por mitogénos (MAPK) y la vía de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K).

II.4. Las catecolaminas

Las catecolaminas endógenas adrenalina, noradrenalina y dopamina actúan por su origen y efectos como neurotransmisores en el sistema nervioso y/o hormonas en el sistema endocrino.

II.4.1 Síntesis y almacenamiento

Las catecolaminas se sintetizan a partir de los aminoácidos, tirosina o fenilalanina, que entran a la célula proveniente de la circulación sanguínea. En el citosol de las células cromafines de la médula suprarrenal o en las neuronas, la tirosina es convertida por la tirosina hidroxilasa a dihidroxifenilalanina (l-dopa). La l-dopa es convertida a dopamina por la l-amino ácido descarboxilasa. A continuación, la dopamina entra al gránulo neurosecretor donde se convierte en noradrenalina. Esta última formada dentro del gránulo debe salir para convertirse en adrenalina por la acción de la feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT). La adrenalina en el citosol se almacena en gránulos de secreción (Fig. 5) (Norman y Litwack, 1997).

II.4.2. Funciones fisiológicas

La adrenalina y la noradrenalina tienen un importante papel regulatorio neuroendocrino. Bajo ciertas circunstancias de alerta, el hipotálamo envía señales en forma de impulsos nerviosos que viajan a través de las fibras nerviosas simpáticas o neuronas preganglionares, atravesando (sin hacer sinapsis) todo un trayecto desde la médula espinal y a lo largo del nervio esplécnico, hasta llegar a la médula suprarrenal, donde hacen contacto con las células cromafines, consideradas neuronas posganglionares modificadas. Las células cromafines contienen gránulos o vesículas de secreción que almacenan a las catecolaminas para ser liberadas directamente al torrente circulatorio.

La adrenalina y la noradrenalina producen una diversidad de respuestas a través de la activación de sus receptores compartidos. En general, se les atribuyen funciones excitadoras a los receptores α e inhibitorias a los β , entre las que destacan:

- el aumento en la glucogenólisis y la gluconeogénesis en el hígado;
- el efecto inotrópico positivo y cronotrópico en el corazón;
- la secreción de amilasa por las glándulas salivales;

- la relajación de la musculatura uterina;
- el aumento en la conversión de triglicéridos a ácidos grasos y glicerol en el tejido adiposo;
- la elevación de la presión sanguínea;
- la broncodilatación en los pulmones;

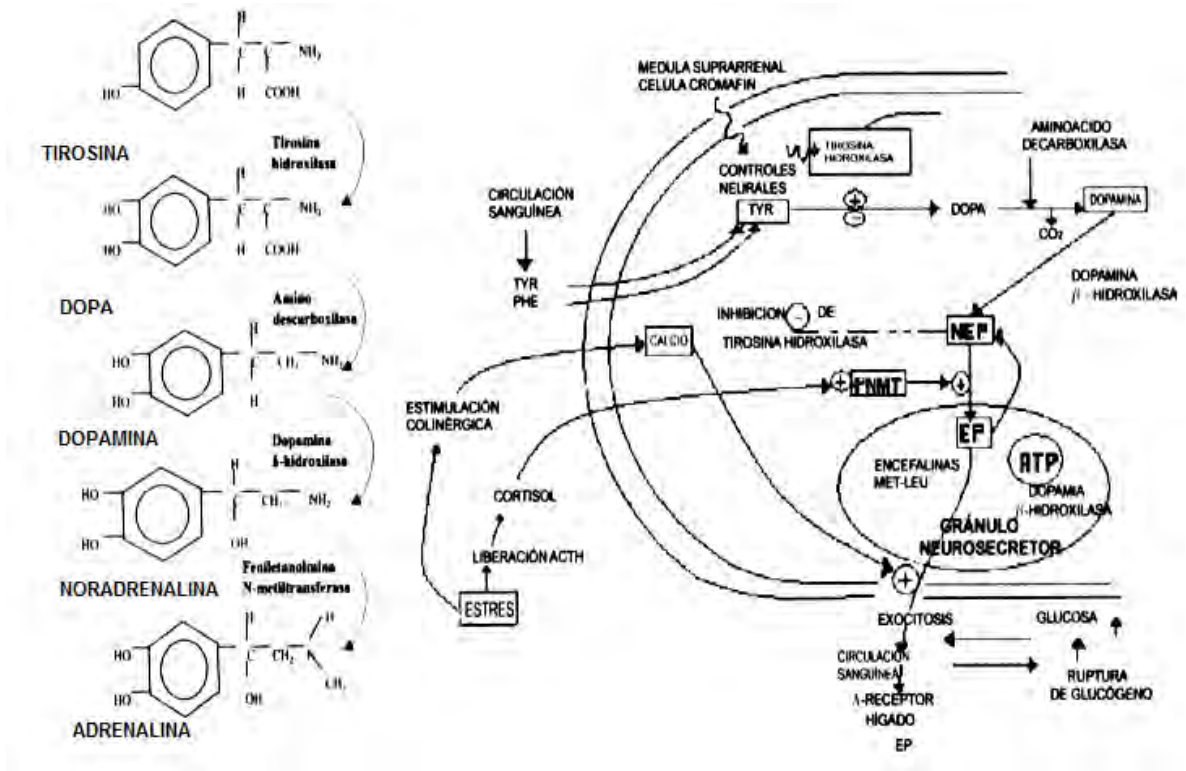


Figura 5.- Biosíntesis, almacenamiento y liberación de las catecolaminas. En el recuadro de la izquierda se muestran las vías de síntesis de la noradrenalina (NE) y adrenalina (EP). En el recuadro de la derecha se muestra la biosíntesis, almacenamiento y liberación del gránulo neurosecretor. (Modificado de Norman y Litwarck, 1997)

II.5 Receptores Adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de GPCRs que median las acciones de las catecolaminas: adrenalina y noradrenalina. Se clasifican en tres familias de acuerdo a su estructura (secuencia de aminoácidos), características farmacológicas, y a su mecanismo de acción (generación de segundos mensajeros). Cada familia se divide en tres subtipos: α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}) y β (β_1 , β_2 y β_3) (Fig. 6). La homología en su secuencia y características estructurales similares sugieren que estos receptores están relacionados evolutivamente, originándose de un gen ancestral común y que subsecuentemente divergieron por duplicación genética, para generar las distintas funciones. Estos receptores tienen una distribución diferencial entre tejidos y especies.

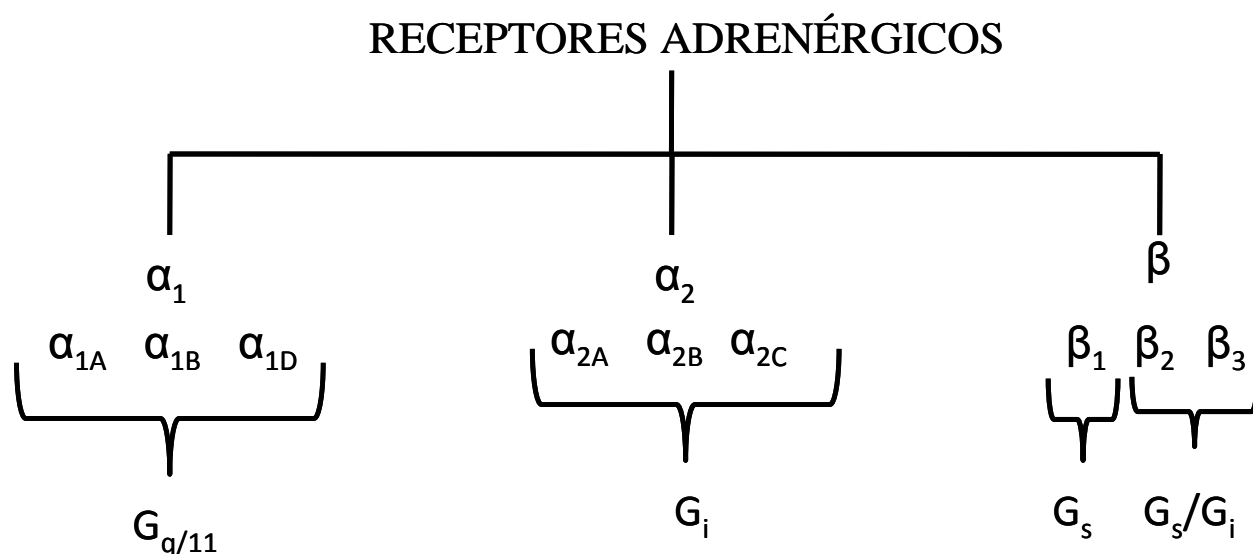


Figura 6.-Subtipos de receptores adrenérgicos y las proteínas G a las que se acoplan.

II.5.2 Estructura de los Receptores Adrenérgicos

La secuencia de aminoácidos de los receptores adrenérgicos indica que hay siete agrupamientos hidrofóbicos de 20-25 residuos cada uno, separados por secuencias de aminoácidos hidrofílicos. Ambos tipos de regiones están conservadas en los receptores acoplados a proteínas G. La secuencia total de los receptores adrenérgicos tiene una

longitud de 466-572 aminoácidos, y el peso molecular deducido de la estructura primaria es de 37-45 kDa. Existe diferencia entre el peso deducido y el observado como resultado de las modificaciones postransduccionales. Estas modificaciones incluyen la adición de polisacáridos, la tioesterificación con ácidos grasos (palmitico o mirístico) y la fosforilación.

El extremo amino terminal se localiza extracelularmente, contiene sitios consenso de glicosilación ligados a asparagina (N-glicosilación) y estos sitios varían en número entre un receptor y otro. El extremo carboxilo terminal está localizado intracelularmente y contiene sitios consenso para la fosforilación por cinasas de serina/treonina.

Las regiones transmembranales (TM) están unidas por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares. Entre los receptores adrenérgicos de la misma familia, la identidad en los dominios transmembranales entre los subtipos del mismo grupo es de 70-80%, y entre subtipos de las diferentes familias es de 30-40%. Estas asas, aunque son variables en tamaño, son similares entre los subtipos de receptores. Las asas extracelulares primera y segunda contienen una cisteína, muy conservada también en otros GPCRs (Audet y Bouvier, 2008).

Los dominios citosólicos están involucrados en el acoplamiento funcional de los receptores y las proteínas G. Los segmentos de la tercera y segunda asas intracelulares determinan la especificidad de las interacciones receptor-proteína G. Dominios específicos del receptor pueden activar directamente a la proteínas G, y en el estado inactivo del receptor estos dominios pueden estar ocultos de la proteína G por otros dominios. Los cambios conformacionales del receptor, inducidos por la unión del agonista, probablemente hacen que estos dominios sean accesibles a la proteína G (Kobilka, 1992). El análisis funcional de receptores adrenérgicos mutantes y las predicciones moleculares sugieren que la Arg²⁵⁴ y la Lys²⁵⁸ en la tercera asa citoplásmica, así como la Leu¹⁵¹ en la segunda asa citoplásmica, conforman los determinantes estructurales envueltos en el acoplamiento de las proteínas G (Greasly, 2001).

En la unión del agonista participan residuos localizados a lo largo de los dominios transmembranales tres a seis, localizados hacia el interior del receptor a diferencia de los sitios para los antagonistas, en los que los residuos de unión dan hacia la superficie extracelular (Hwa, 1995; Ishiguro, 2002; Nagaoka, 2008; Zhao, 1996).

La adrenalina consta de un grupo amina, un anillo aromático (o catecol) con sus grupos hidroxilo y una cadena β -hidroxietil. Con base en estos componentes Easson y Stedman (1930), propusieron una de las primeras teorías sobre la relación entre estructura y actividad, estableciendo que estos tres grupos químicos son puntos de contacto para la interacción con los receptores adrenérgicos (Fig. 7). Con el desarrollo de la cristalografía, el modelaje molecular y mediante estudios de mutagénesis sitio dirigida, este modelo ha tenido algunas variaciones en cuanto a la especificidad del subtipo. El Asp¹²⁵ que interacciona con el grupo amino del receptor α_{1B} adrenérgico en el TM3 está altamente

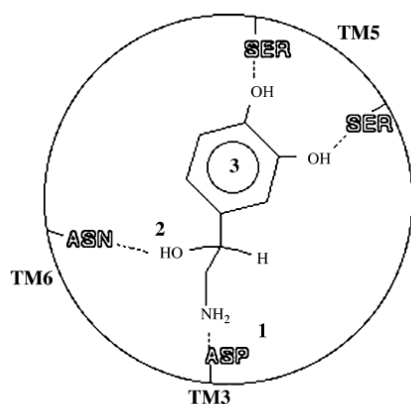


Figura 7.-Modelo de la interacción receptor-agonista. De acuerdo a la hipótesis de las catecolaminas interactúan con el receptor en tres puntos de contacto: 1) la amina protonada de la noradrenalina interacciona con el ácido aspártico (ASP) en el TM3, 2) el β -hidroxilo en un centro quiral interactúa con una asparagina (ASN) en el TM6, y 3) el anillo aromático a través de los grupos OH con las serinas (SER) en el TM5.

conservado en todos los GPCRs que unen aminas biogénicas; las serinas en TM5 que se unen por puentes de hidrógeno con los grupos meta- y para-hidroxilo del anillo catecol, también están conservados (Hwa, 1996) y un grupo de aminoácidos aromáticos en los TM6 y TM7, además participan en la unión al ligando, la Phe³¹⁰ (Chen, 1999) a través de la interacción con el anillo catecol. En la Figura 8 se muestra un modelo molecular.

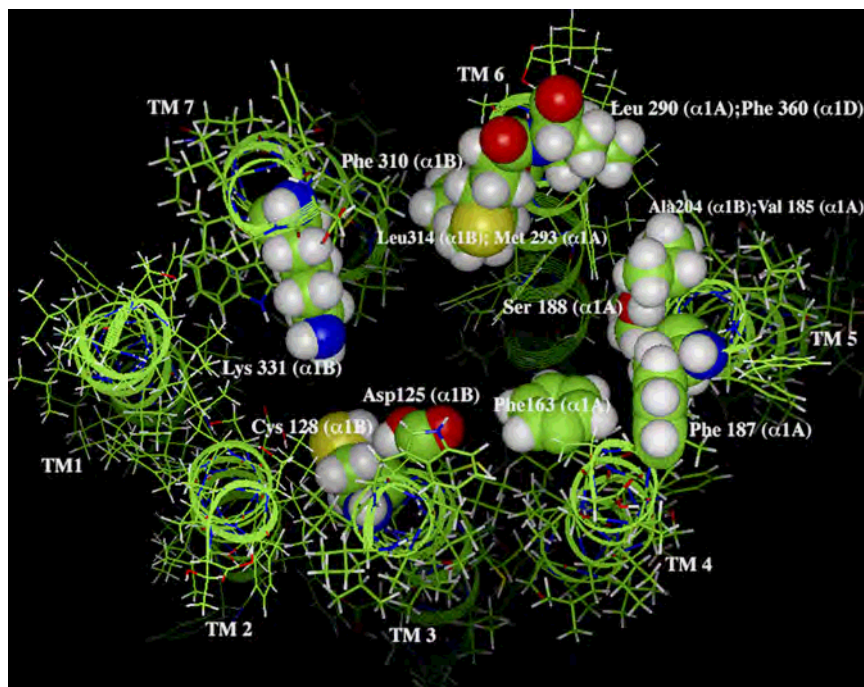


Figura 8.-Modelo molecular de los receptores α_1 adrenérgicos. El modelado ejemplifica los aminoácidos del receptor adrenérgico del subtipo α_1 involucrados en la unión con agonistas. (Tomado de Pérez, 2007)

II.5.3 Farmacología

El conocimiento de las propiedades farmacológicas ha permitido descubrir la existencia de heterogeneidad de receptores α_1 entre tejidos y especies, así como el desarrollo de fármacos con aplicaciones clínicas.

Dale en 1906 hace por primera vez mención de un mecanismo receptivo para la adrenalina, demostrando que la administración de una dosis de ergot bloquea la capacidad de la adrenalina para incrementar la presión sanguínea pero sin efecto en la aceleración cardíaca.

El descubrimiento de la existencia de familias de receptores adrenérgicos tuvo su origen en 1948 por Alhquist, quien al observar los efectos antagónicos (contracción-relajación) de los análogos de la adrenalina a diferentes concentraciones, y los atribuyó a la presencia de dos poblaciones de receptores designados como α y β . Este descubrimiento vino a modificar la idea de la presencia de una sola población de receptores e inició la clasificación en los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos de acuerdo a sus

propiedades farmacológicas, que toma en cuenta la afinidad del receptor por ciertos compuestos agonistas y antagonistas.

Se han utilizado varios radioligandos para estudiar la unión de los RA- α_1 entre los que destacan ^3H -prazosina y ^{125}I -HEAT por su alta afinidad y selectividad. Las catecolaminas muestran una afinidad 20 veces mayor por el RA- α_{1D} que sobre los otros dos subtipos de receptores α_1 adrenérgicos. Hasta la fecha, se siguen sintetizando agonistas y antagonistas selectivos para cada subtipo, entre los que se encuentran: la metoxamina y el WB4101 para el α_{1A} ; el AH1110 y la ciclozasina para el α_{1B} ; la noradrenalina y el BMY7378 para el α_{1D} (Michel, 1995). Además de estos fármacos, se han identificado otros como el 5-metil-urapidil y la niguldipina, antagonistas para los α_{1A} , con una selectividad 100-500 veces más alta que para el α_{1B} , y muy baja para el α_{1D} . La tamsulosina tiene una alta selectividad por los α_{1A} seguida por los α_{1D} (García-Sáinz, 1995). La mayoría de las imidazolininas presentan mayor afinidad por el α_{1A} , (Horie, 1995). En cuanto a la sensibilidad a la cloroetilclonidina, el receptor α_{1B} es el más sensible seguido por el α_{1D} y el α_{1A} (Huerta-Bahena, 1982).

II.5.4 Mecanismos de Señalización

Sistema de los fosfoinosítidos/calcio.

El mecanismo de transducción de la señal comienza cuando el ligando (noradrenalina o adrenalina) se une al receptor adrenérgico α_1 , y a través del acoplamiento con una proteína $G_{q/11}$ activa a la fosfolipasa C ($\text{PLC-}\beta$), que promueve la hidrólisis de fosfatidil inositol 1, 4 bisfosfato (PIP_2), un fosfolípido localizado en la membrana plasmática, produciendo dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1, 4, 5 trisfosfato (IP_3). Este último interacciona con un receptor canal intracelular del retículo endoplásmico, con la concomitante liberación de calcio intracelular. El calcio liberado y el DAG estimulan a la PKC que, junto con otras cinasas, propagan la señal intracelularmente (Fig. 9).

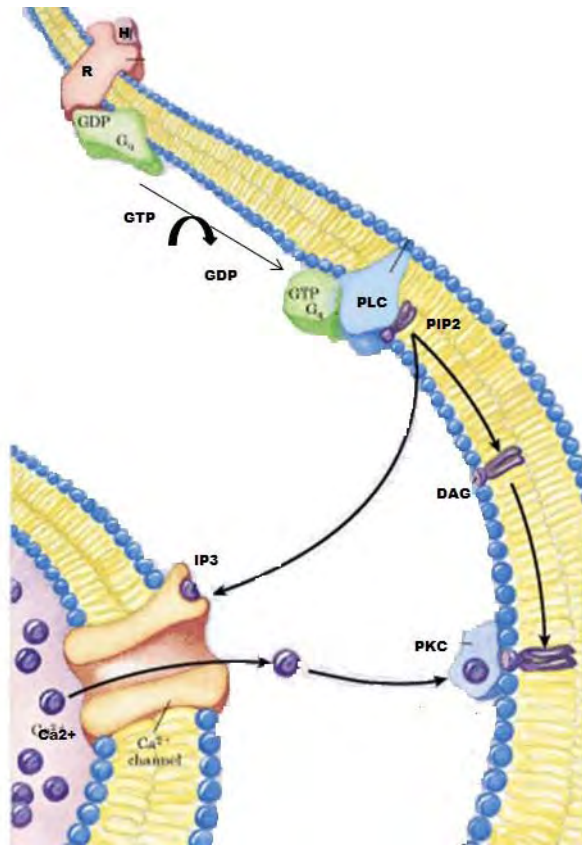


Figura 9.- Sistema de fosfoinosítidos/calcio. El receptor (R) es activado por la unión de una hormona (H), se promueve el intercambio de GDP por GTP unido a la proteína Gq activando a la fosfolipasa C (PLC), a su vez convierte el fosfatidil inositol 1,4 bisfosfato (PIP₂) en IP₃ y DAG. El IP₃ se une a sus receptores canal y causa la liberación de calcio del retículo endoplásmico, y junto con el DAG activa a la PKC (Lehninger, 2005).

El DAG permanece en la membrana y subsecuentemente es hidrolizado por una DAG lipasa, liberando ácido araquidónico o puede ser fosforilado a ácido fosfatídico por una DAG cinasa. El recambio de fosfoinosítidos está directamente relacionado con la actividad de la PKC. Esta familia de enzimas juega papeles de crucial importancia en la transmisión de la información de un gran número de mensajeros extracelulares, que regulan una serie de procesos celulares que llevan a una respuesta biológica, que incluye: metabolismo, secreción, contracción, actividad neural y proliferación celular, entre otros (Berridge, 1989). La activación de la PKC a través de los ésteres de forbol se ha visto que inhibe las acciones α_1 adrenérgicas observándose un desacoplamiento del recambio de fosfoinosítidos (Corvera, 1984, 1986) paralelo a la fosforilación de los RA- α_1 . (Leeb-Lundenberg, 1985). Los RA- α_1 presentan la siguiente sensibilidad a las acciones de la PKC $\alpha_{1d} > \alpha_{1b} \gg \alpha_{1a}$ (Vazquez-Prado y García-Sáinz, 1996).

II.5. Regulación

Desde que el receptor es activado, hasta el desencadenamiento de la respuesta biológica, experimenta una serie de procesos que regulan positivamente o negativamente su función, tales como la desensibilización, la resensibilización, la fosforilación, la desfosforilación, la internalización, el reciclamiento, la degradación y el cambio en el número de receptores. Los procesos mencionados ocurren con cierta velocidad, grado de atenuación/activación y duración. Los pasos iniciales (activación y acoplamiento al sistema de transducción) se llevan a cabo en segundos a minutos y requieren de la unión de proteínas adaptadoras al receptor fosforilado. El receptor es entonces secuestrado o internalizado, lo que se realiza en un lapso de minutos a horas, en un compartimiento intracelular, lo que permite la desfosforilación, por fosfatasa específicas para su degradación o reciclaje. Hay además cambios en la biosíntesis (transcripción-traducción) de los receptores (Fig. 10).

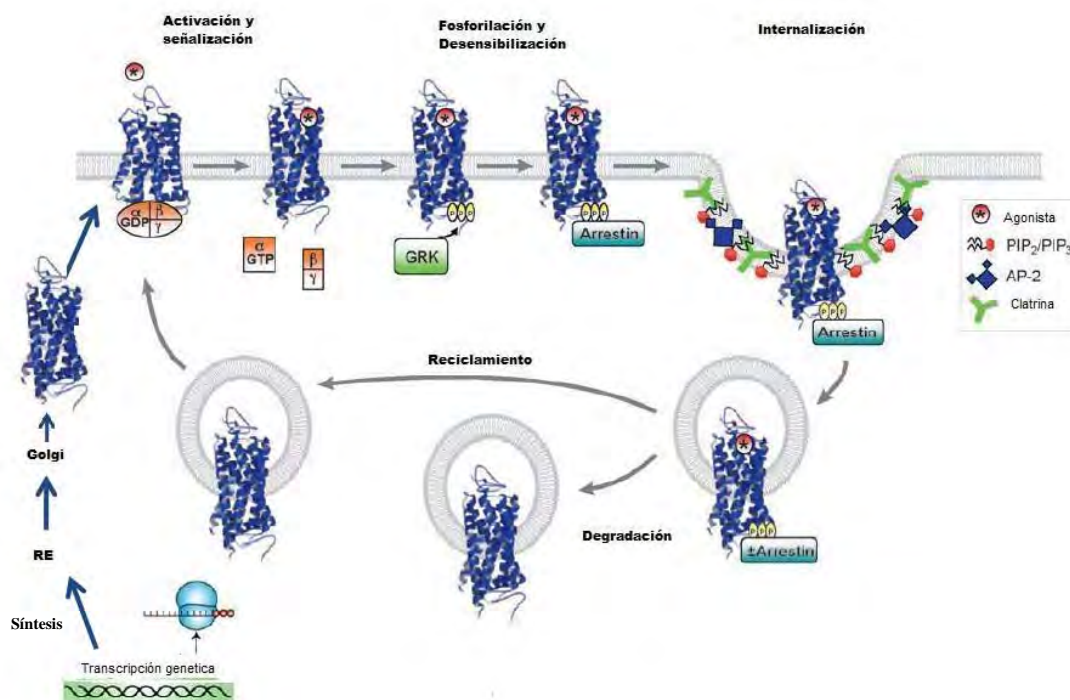


Figura 10.-Regulación de los receptores adrenérgicos.

II.5.1. Desensibilización

La desensibilización es un mecanismo de adaptación en los sistemas biológicos, a través del cual se reduce la respuesta de la célula a estímulos sucesivos y/o prolongados. Este proceso sucede después del estímulo hormonal y generalmente se asocia a la fosforilación del receptor, catalizada por diferentes cinasas que actúan de manera simultánea o secuencial. La fosforilación del receptor produce el desacoplamiento de la proteína G y la disminución en su función es atenuada o abatida (Lefkowitz, 1998; García-Sáinz, 1999).

Existen dos formas de desensibilización: la homóloga específica del agonista y la heteróloga o por agentes diferentes a los que activan al receptor. Cabe destacar que ambas desensibilizaciones pueden ocurrir simultáneamente en una célula.

La desensibilización homóloga sucede cuando un receptor es activado por su agonista, lo que reduce la subsecuente respuesta del mismo receptor, sin efecto en otro sistema receptor de la misma célula. En este tipo de desensibilización participan las cinasas de GRKs y las arrestinas.

Las GRKs son una familia de siete cinasas de serina/treonina que fosforilan a los receptores acoplados a proteínas G, sólo cuando se encuentran unidos al agonista, probablemente debido a que los sitios de fosforilación quedan expuestos como consecuencia del cambio conformacional que adoptan al ser activados.

Las GRKs muestra una organización similar, con un dominio catalítico, una región carboxilo terminal que contribuye a la señalización y translocación de la cinasa a la membrana plasmática, y un extremo amino terminal que es importante en el reconocimiento del receptor y que a su vez contiene un dominio semejante a los RGS (reguladores de la señal de proteínas G). Con base en su secuencia y función, esta familia de cinasas está subdividida en tres grupos: 1) GRK1 (cinasa de rodopsina), GRK7 (cinasa opsina); 2) GRK2 (cinasa 1 del receptor β -adrenérgico), GRK3 (cinasa 2 del receptor β -adrenérgico); y 3) GRK4, GRK5, GRK6 (Ferguson, 2001). La fosforilación catalizada por estas cinasas incrementa la afinidad del receptor por las arrestinas (Krupnic, 1998).

Las arrestinas contribuyen a la desensibilización, ya sea desacoplando directamente al receptor o favoreciendo su/la endocitosis. La unión de las arrestinas y el receptor a

moléculas de clatrina inicia la internalización del receptor fosforilado dentro de vesículas. Posteriormente, para su reciclamiento y resensibilización participan una serie de fosfatasa que interaccionan con los receptores vesicularizados e internalizados, para desfosforilarlos y que de esta manera regresen (reciclamiento) a la membrana plasmática o bien sean degradados en los lisosomas (Zhan, 1997).

Los elementos estructurales que contribuyen a la unión de las arrestinas incluyen: 1) una región acídica, localizada en el extremo carboxilo terminal, que controla el reconocimiento de la forma fosforilada y activa del receptor, sin participar directamente con éste; 2) una región básica ubicada en el extremo amino terminal, que participa directamente en la interacción con el receptor y tiene un papel regulador por medio de la interacción con la región acídica, y 3) dos dominios centrales que participan directamente en la unión específica y selectiva del receptor (Gurevitch, 1995).

La desensibilización heteróloga o no específica de agonista, consiste en la atenuación de la respuesta de un receptor determinado, por la activación de receptores diferentes. Los GPCRs también pueden ser fosforilados por cinasas dependientes de segundos mensajeros, como la PKC por el Ca^{2+} y la PKA por el AMPc. Estas cinasas no sólo afectan a receptores estimulados por su agonista, sino también a otros receptores, lo que promueve una comunicación cruzada entre ellos (“cross-talk”). La activación de las cinasas de las diferentes vías de transducción es suficiente para causar la fosforilación de algunos receptores y la activación de éstos por su agonista no afecta la cinética de fosforilación.

Las PKCs son un grupo de cinasas de serina/treonina, constituido por al menos doce isoformas que se clasifican en tres subgrupos de acuerdo al dominio regulatorio N-terminal, que determina su sensibilidad a los segundos mensajeros: Ca^{2+} y DAG. A) Las isoformas clásicas, PKC α , PKC β I, PKC β y PKC γ , son reguladas por Ca^{2+} y DAG; B) las isoformas nuevas, PKC δ , PKC ϵ , PKC θ y PKC η son insensibles a Ca^{2+} y C) las isoformas atípicas, PKC ζ y PKC λ , no son reguladas ni por Ca^{2+} ni por DAG. Todas las PKCs tienen un dominio con actividad de cinasa (KD) conservado, que es autoinhibido por el dominio de pseudosustrato (PSE), el cual bloquea el acceso al sitio activo. Las isoformas convencionales contienen un dominio C1, que une DAG y ésteres de forbol, y un dominio C2 que une grupos de fosfatidilserina de manera dependiente de Ca^{2+} . La isoformas nuevas

contienen el dominio C1 y un dominio semejante C2 no funcional, que no contiene la región de unión a calcio; las atípicas no contienen ninguno de estos dos dominios. Cuando es activada, la PKC se transloca a la membrana plasmática en donde se une a fosfolípidos. Las PKCs tienen una expresión ubicua, pueden estar presentes en el mismo tipo celular y responder a los mismos activadores, pero se translocan a diversos sitios intracelulares mediando diferentes funciones incluso en ocasiones opuestas. (Liu, 1998; Newton, 2003)

En experimentos con receptores adrenérgicos, en especial con el receptor adrenérgico α_{1B} , se ha visto que la activación del receptor por noradrenalina promueve su desensibilización, la fosforilación e internalización con la participación de PKC. Los blancos potenciales de esta cinasa son el receptor y la PLC, y su activación atenúa la actividad del recambio de fosfoinosítidos (Corvera y García-Sáinz, 1984; Corvera et al, 1986; García-Sáinz, 1985, 1986; Leeb-Lundberg, 1987; Lattion, 1994). En el RA- α_{1B} los sitios de fosforilación se han localizado e involucran a las Ser404, Ser408 y Ser410 cuya fosforilación se asocia a las GRKs y a la Ser394 y Ser400 corresponden a la fosforilación mediada por PKC (Diviani et al, 1996, 1997).

II.4.6.2 Internalización

Los receptores adrenérgicos se encuentran generalmente inmersos en la membrana plasmática. Estos son internalizados rápidamente después de la estimulación por su agonista, por un fenómeno conocido como endocitosis, que implica el transporte de los receptores de la superficie celular al interior de la célula. Existen al menos tres caminos diferentes por los que los receptores pueden viajar al interior de la célula: 1) endocitosis dependiente de clatrina; 2) endocitosis dependiente de caveola y lípidos “raft”; y 3) endocitosis independiente de clatrina y caveolas. Se detallará la primera por ser la vía principal llevada a cabo por los receptores adrenérgicos.

Los receptores adrenérgicos activados por su agonista generalmente entran a la vía dependiente de clatrina, que es promovida por la fosforilación de los receptores, seguida por la unión de las arrestinas, y a continuación son distribuidos en zonas de la membrana plasmática (pits) formadas por el reclutamiento de proteínas del citosol, principalmente de clatrina (Chalothorn, 2002; Fonseca, 1995; McCune, 2000; Morris, 2008). La clatrina, consiste de una unidad ensambladora conocida como “*triskelion*”, que es una estructura

formada por tres cadenas ligeras y tres pesadas. Cada cadena pesada es un polipéptido con cinco regiones funcionales. En el amino terminal se encuentra la región que contiene un sitio de unión que interacciona con proteínas endocíticas a través de motivos denominados “cajas de clatrina”. Posteriormente, estas regiones recubiertas de clatrina son invaginadas e interactúan específicamente con la proteína adaptadora AP-2, (que pertenece a una familia encargada de mediar la formación de vesículas en diferentes localizaciones celulares); este proceso es dependiente de la dinamina, una proteína con actividad de GTPasa que se encarga de constreñir la membrana plasmática e inducir el desprendimiento de la vesícula. Las vesículas endocíticas formadas contienen a los complejos receptor-ligando, y se encuentran encapsuladas por una cobertura de clatrina. Se han identificado más de 30 proteínas que se unen, cada una, directamente o indirectamente a esta compleja triada (receptor, clatrina y AP-2); (Ferguson, 1996; Diviani, 2003).

Los receptores recién endocitados, se encuentran en los endosomas primarios, de ahí pasarán a otros compartimentos dependiendo la ruta elegida. Los GPCRs pueden también estar por un tiempo internalizados en los denominados endosomas tardíos (o cuerpos multivesiculares), antes de direccionarse hacia alguna de las vías postendocíticas. La compartimentalización de los receptores en diferentes vesículas marcará su destino celular, por lo que la internalización es considerada parte fundamental del proceso de desensibilización.

II.4.6.3 Reciclaje y Degradación

La ruta de reciclaje se encarga de restaurar los GPCRs en la membrana plasmática, para lo cual el receptor es pasado a una vesícula asociada a fosfatasa (o endosoma de reciclamiento), que media la defosforilación de los receptores, y a continuación son reciclados a la membrana plasmática, en un estado resensibilizado en el cual son totalmente funcionales. La otra vía que pueden tomar es la degradativa, por la cual los receptores son transportados a los lisosomas, donde son proteolizados o pasan por el proceso de ubiquitinación al proteosoma.

En la última vía existe una atenuación de la respuesta a largo plazo mediante un proceso conocido como “down regulation” o regulación a la baja, donde participan

mecanismos transcripcionales y postranscripcionales que provoca una reducción en el RNAm y degradación de la proteína), provocando una disminución en el número total de receptores en la membrana (Bunemann, 1999).

Existen determinantes moleculares dentro de los diferentes GPCRs que parecen regular el tráfico en y hacia compartimentos intracelulares. Se han localizado algunos aminoácidos presentes en dominios intracelulares de los receptores que marcan y median la endocitosis y la distribución (*sorting*) de estos receptores. Estas secuencias actúan como sitios de reconocimiento para componentes de la maquinaria proteica, involucrada en el proceso de tráfico vesicular. Destacan dos tipos de motivos, los de di-leucina (LL o LXL) y los basados en tirosinas (YXX) (Paing, 2004). También existen otros dominios que acarrean una señal de secuestro. Por ejemplo, PDZ y NSF que dirigen a los receptores hacia la vía de reciclaje, y la nexina-1 o GASP (GPCR-associated sorting protein) que lo hace a la degradación (Trejo, 2005).

Varias proteínas de la familia de las proteínas G pequeñas participan en este proceso de degradación entre las que destacan las pertenecientes a la familia Rab.

Las Rab GTPasas son el grupo más diverso de proteínas G pequeñas semejantes a la familia de Ras, se encuentran constituidas por más de 60 miembros. Las proteínas Rab controlan una variedad de procesos celulares como endocitosis, fusión endosomal y exocitosis. La familia de Rab GTPasas se distingue por tener un motivo Rab F; son modificadas postraduccionalmente por la adición de dos grupos geranil al extremo C-terminal, lo que permite su asociación con la membrana. El estado de activación de estas proteínas está regulado por proteínas activantes de GTPasas (GAPs), que aceleran la hidrólisis del GTP a GDP, o por factores de intercambio nucleótidos de guanina (GEFs) que catalizan el intercambio del GDP unido por GTP. Las Rab se localizan en compartimentos de las vías endocítica y exocítica, además diferentes isoformas están unidas en las membranas de diferentes organelos; así, Rab 1 y 2 se localizan en vesículas que median el transporte del retículo endoplasmático al aparato de Golgi; Rab 4, 5 y 11 se localizan en endosomas tempranos; Rab 7 y 9 se localizan en endosomas tardíos y en lisosomas. Rab 5 tiene una importante participación en la endocitosis y tráfico de GPCRs, esta GTPasa se encuentra localizada en la membrana plasmática, vesículas cubiertas de clatrina y endosomas tempranos (Seachrist y Ferguson, 2003).

II.4.6.4 Interacciones intermoleculares

Oligomerización entre receptores

El concepto que se tenía tradicionalmente de que los GPCRs funcionan como entidades individuales (monómeros), es decir que a un sólo receptor se le une un ligando, ha cambiado en los últimos tiempos. Existe evidencia bioquímica, biofísica y farmacológica que sugiere que varios receptores pueden encontrarse interaccionando físicamente formando agrupaciones (complejos oligoméricos o dímeros). Se han encontrado diferentes combinaciones de dímeros entre los GPCRs, incluyendo a los receptores adrenérgicos, los cuales se pueden dar entre el mismo tipo de receptores (homodímeros), entre subtipos o entre receptores de diferentes familias (heterodímeros). La dimerización puede modificar las propiedades físicas, farmacológicas y funcionales y en algunos casos se ha visto que es esencial para la función desempeñada por estos receptores. La dimerización puede involucrar la interacción con la región extracelular, los dominios transmembranales y/o el carboxilo terminal; y la naturaleza de la asociación entre los oligómeros puede involucrar uniones covalentes (como enlaces disulfuro) y/o interacciones no covalentes (hidrofóbicas).

Se ha cuestionado si los GPCRs existen como dímeros preformados (constitutivos) o si son unidades dinámicas que son asociadas en presencia del ligando. La evidencia experimental muestra que pueden existir los tres escenarios: 1) los dímeros preexisten pero son modificados por el agonista; 2) el complejo preformado es estable y no cambia con el ligando; o 3) el ligando es fundamental para la formación y función del dímero.

Tanto la homo- como la heterodimerización constitutiva parece ocurrir dentro del retículo endoplásmico (RE), por lo tanto la dimerización puede ser un requerimiento común para que los GPCRs pasen los puntos de control de calidad a lo largo de la vía biosintética. Uno de los mejor caracterizados es el del receptor del ácido γ -aminobutírico metabotrópico B (GABA_BR), cuando es funcional, es un heterodímero compuesto de dos unidades homólogas GABA_{B1} y GABA_{B2}, cada una tiene una función diferente: GABA_{B1} provee el sitio de unión y GABA_{B2}, promueve el transporte a la superficie celular de GABA_{B1} y el eficiente acoplamiento a la proteína G. Se ha demostrado que el GABA_{B2} sirve para enmascarar el motivo de retención al retículo endoplásmico, localizado en carboxilo terminal del GABA_{B1}. (Pin, 2004)

En los primeros reportes se encontró que los tres subtipos de receptores α_1 adrenérgicos existen como monómeros, dímeros y oligómeros detectados por western blot (Vicentic, 2002); más tarde, esto fue confirmado con las metodologías de BRET y FRET que utilizan agentes bioluminiscentes (luciferasa) o fluorescentes (proteína verde fluorescente), unidos a los receptores. A la fecha, se han encontrado diferentes parejas de heterodímeros entre los adrenérgicos incluyendo: β_1/β_2 , β_1/α_{2A} , α_{1A}/α_{1B} , α_{1B}/α_{1D} y α_{1D}/β_2 (Hague, 2004; Mercier, 2002; Stanasila, 2003; Uberti, 2003; Xu, 2003).

La heterodimerización de los receptores adrenérgicos α_1 es subtipo específico, el receptor α_{1B} interactúa con α_{1A} y α_{1D} , pero no interactúan α_{1A} y α_{1D} . En el caso de la heterodimerización α_{1B}/α_{1D} , el α_{1B} se comporta como una chaperona, promoviendo la expresión membranal del α_{1D} y observándose un perfil farmacológico diferente (Uberti, 2003; Hague, 2004).

Estos encuentros sugieren que los heterodímeros forman complejos funcionales con distintas especificidades y propiedades de señalización, en el cual cada receptor individual puede ser responsable para las funciones específicas.

III.-ANTECEDENTES

El receptor adrenérgico α_{1D} fue descubierto (Perez et al, 1991) gracias al desarrollo de nuevas técnicas y estrategias moleculares (clonación, agentes químicos más selectivos para cada subtipo y de mejores métodos bioquímicos de detección).

Aunque en un principio hubo controversia con respecto a que el receptor adrenérgico α_{1D} fuera en realidad un nuevo subtipo distinto al α_{1A} (Lomasney et al, 1991), muchos trabajos han constatado la existencia de este tercer subtipo de receptor adrenérgico. Este encuentro llevó a que se modificara la clasificación y la nomenclatura de los receptores adrenérgicos de acuerdo a nuevos criterios (Hieble et al, 1995; Michel et al, 1995).

La primera secuencia clonada del receptor adrenérgico (RA) α_{1D} fue de rata (Lomasney et al, 1991; Perez et al, 1991) y casi inmediatamente se obtuvieron las secuencias del receptor α_{1D} de humano (Bruno et al, 1991; Forray et al, 1994; Schwinn et al, 1995; Esbenshade et al, 1995) y de conejo (Suzuki et al, 1997). Las diferentes isoformas del RA α_{1D} son muy parecidas, presentando entre ellas un alto grado de identidad (83-85%). Sin embargo, varían en cuanto al largo de la cadena de aminoácidos y al peso molecular. El receptor de humano es más grande que el receptor de rata (572 respecto a 561 aminoácidos). El peso molecular estimado del receptor α_{1D} es de 59-60 kDa y el real es de 70-80 kDa. Estas diferencias pueden deberse al estado de N-glicosilación de las argininas del extremo amino terminal. La principal diferencia estructural entre los receptores de diferentes especies se sitúa en las regiones carboxilo y amino terminales.

El estudio del receptor adrenérgico α_{1D} humano ha sido complicado debido a que la expresión y el acoplamiento al sistema de transducción es deficiente, en comparación con los otros dos subtipos. Además, no hay anticuerpos selectivos ni fármacos específicos que reconozcan al receptor. El agente más selectivo utilizado hasta el momento, para caracterizarlo farmacológicamente, es el BMY7378, que actúa como antagonista (Goetz et al, 1995).

Aún así, el RA- α_{1D} se ha expresado en diferentes líneas celulares, por lo que se ha obtenido información sobre su funcionamiento. La presencia del receptor adrenérgico α_{1D} en diferentes tejidos se ha observado por la distribución del RNA mensajero. El receptor

α_{1D} humano es abundante en: aorta, corteza cerebral y próstata, también hay en pulmón, corazón, riñón y bazo (Price et al, 1994); el receptor α_{1D} de rata está presente ampliamente en vasos deferentes, aorta, corteza cerebral e hipocampo.

El receptor se acopla al sistema de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} vía proteínas Gq a través de la activación de la PLC, pero menos eficientemente que los otros subtipos. Se ha visto que el receptor de rata exhibe actividad intrínseca independiente del estímulo del agonista, y que algunos antagonistas pueden actuar como agonistas inversos, disminuyendo el nivel basal en la liberación de calcio (García-Sáinz y Torres-Padilla, 1999). De la misma manera, presenta un nivel basal alto de producción de fosfatos de inositol.

La localización del receptor dentro de la célula es peculiar, ya que siendo un receptor de membrana celular, se le ha encontrado predominantemente en vesículas intracelulares (McCune et al, 2000; Chalothorn et al, 2002). En este comportamiento se involucra la señal dada por su amino terminal (Pupo et al, 2003; Hague et al, 2004).

En trabajos recientes de nuestro laboratorio se demuestra que el receptor α_{1D} de rata y humano se desensibiliza y es susceptible de fosforilarse por PKC (García-Sáinz et al, 2001, 2004). El receptor de rata y el de humano son también fosforilados por la acción de agentes no adrenérgicos como la endotelina, el ácido lisofosfatídico y por algunos factores de crecimiento, lo que sugiere una modulación heteróloga (García-Sáinz et al, 2001; Rodríguez-Pérez et al, 2009). Además, es capaz de heterodimerizarse con el receptor α_{1B} y con el receptor β_2 , lo que promueve una redistribución intracelular del receptor hacia la superficie (Hague et al, 2004, 2006; Uberti et al, 2005). Un papel importante se le ha asignado en el sistema circulatorio, en especial en arterias y en la contracción del músculo liso (Gisbert, et al, 2000; Ibarra, et al, 1997; Tanue, 2002c; Villalobos-Molina e Ibarra, 1996).

IV.-JUSTIFICACIÓN

La información acerca de la regulación del receptor α_{1D} adrenérgico es mínima en comparación con la de otros subtipos. Nuestro grupo de investigación está interesado en establecer el mecanismo molecular de la desensibilización de este receptor, y el papel que juega la fosforilación en este proceso.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que el RA- α_{1D} es una fosfoproteína, cuyo estado de fosforilación se asocia a la desensibilización homóloga (dependiente de agonista) y heteróloga (independiente del agonista), esta última ha sido poco explorada en este receptor. Sin embargo, la información de los dominios estructurales que determinan la función y la regulación de este subtipo es escasa (prácticamente nula). Por tal motivo, decidimos abordar este aspecto. La estrategia experimental consistió en generar dos líneas celulares que expresan establemente dos formas mutantes del RA- α_{1D} : un receptor al que se le eliminaron los primeros 79 aminoácidos del amino terminal, denominado ΔN ; y otro sin el carboxilo y sin el amino terminales, o $\Delta N\Delta C$. La construcción ΔN fue utilizada como una herramienta para aumentar su expresión en membrana, para compararlo con el RA- α_{1D} carente tanto del amino como del carboxilo terminales, y así determinar si esta última región es esencial para la regulación, debido a que tiene múltiples sitios posibles de fosforilación.

V.-HIPÓTESIS

La desensibilización del receptor α_{1D} adrenérgico humano es dependiente de su extremo carboxilo terminal.

VI.-OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la desensibilización del receptor α_{1D} adrenérgico humano y la participación del dominio carboxilo terminal en este proceso.

Objetivos Particulares

- Construcción de formas truncas del receptor α_{1D} adrenérgico humano:
 - 1) sin los primeros 79 aminoácidos del amino terminal (ΔN); y
 - 2) sin el carboxilo terminal y sin el amino terminal ($\Delta N-\Delta C$), que no tiene del aminoácido 441 al 572, ni los aminoácidos 1 al 79.
- Expresión estable de las diferentes formas truncas del receptor α_{1D} adrenérgico humano en las células Rat-1.
- Identificación de los receptores α_{1D} adrenérgicos humanos truncos por fotomarcaje.
- Determinación de la cantidad de receptores α_{1D} adrenérgicos humanos expresados en cada una de las construcciones, mediante estudios de unión a radioligando.
- Análisis funcional de cada una de las construcciones del receptor α_{1D} adrenérgico humano, midiendo la producción de los segundos mensajeros calcio y fosfatos de inositol.
- Determinación del grado de fosforilación del receptor α_{1D} adrenérgico humano y relacionarlo con su desensibilización.
- Caracterizar la desensibilización homóloga y heteróloga del receptor α_{1D} adrenérgico humano. Esta última por la activación de receptores no adrenérgicos de la familia de los GPCRs, como los receptores a bradicinina (BK), a endotelina (ET), a esfingosina 1-fosfato (S1P) y al ácido lisofosfatídico (LPA). Así también por los receptores pertenecientes a la familia de los RTKs como a la insulina, al factor de crecimiento epidermal (EGF), al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

VII.-MATERIAL

Reactivos

NA ((-)-Noradrenalina), BMY 7378 (8-[2- [4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinil] etil]-8-azaspiro [4.5] decano-7,9-dione dihidrocloruro), LPA (Ácido Lisofosfatídico), TPA (Acetato de Tetradecanoil Forbol), EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas), Insulina, IGF-I (Factor de Crecimiento similar a la Insulina-1), Bradicinina, Endotelina, Esfingosina fosfato-1, Estaurosporina, Wormanina, Bacitracina, Inhibidor de tripsina, Leupeptina, Hepes, Pirofosfato de sodio, Fluoruro de sodio, Cloruro de magnesio, EDTA (Ácido Etilen-di-amino-tetra-acético), EGTA (Ácido Etilen Glicol tetra-acético), β -Glicerofosfato, Formato de amonio y de sodio, PMSF (Fluoruro de Fenil Metil Sulfonilo), SDS (Dodecil sulfato de sodio), PPO (2,5-difenil oxazol) y Tritón X-100 fueron de Sigma; BIM (bis-indolil-maleimida I) y LY294002 (2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-1) fueron Calbiochem. Fura-2AM acetometil ester fue de Molecular Probes. El ácido fórmico fue de Fulka; [125 I]-aril azido prazosina (2200Ci/mmol) y [2,3- 3 H]-mio-Inositol (22.9Ci/mmol) se compraron de New England Nuclear. La [3 H]-tamsulosina (56.3 Ci/mmol) fue donada por Yamanouchi Europe. La proteína A y G acopladas a sefarosa fueron de Upstate Biotech. El kit BD Advantage™ GC2 Polymerase Mix de Clontech Laboratories; El kit QIAquick Gel Extraction, los amortiguadores y las columnas para purificar el plásmido fueron de Qiagen. El kit de ligación de DNA de Roche Molecular Biochemicals. Los fosfatos de sodio y cloruro de sodio fueron de Baker; las columnas de Dowex AGI-X8 de Bio Rad. El plásmido pcDNA1neo conteniendo al receptor α_{1D} adrenérgico humano nativo fue donado por el Dr. Marvin L. Bayne (Merck). El anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítotope de la hemaglutinina (HA) fue de Covance (# de catálogo: MMS-101P). Un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra una región dentro del carboxilo terminal del receptor α_{1D} adrenérgico de rata (secuencia: LREWLLGPLQR) fue generado en el laboratorio (García-Sáinz, et al, 2001).

Cultivo

Medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), Optimem, SFB (suero fetal bovino), tripsina, estreptomicina, penicilina, anfotericina B, G418, bicarbonato de sodio, obtenidos de Gibco Life Technologies; Lipofectamina 2000 y la cepa bacteriana competente DH5 α adquirida de Invitrogen; Medio de cultivo LB (medio de Luria Bertani), peptona de caseína y extracto de levadura, agar, ampicilina, kanamicina, cloruro de calcio y la RNAasa fueron de Sigma.

Cultivo celular: Las células Rat-1 fueron crecidas en DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal, G418 300 o 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, penicilina 100 U/mL y anfoterecina B 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37 °C bajo una atmósfera de 95 % aire/5 % CO₂.

VIII.-METODOLOGÍA

Construcción de los receptores adrenérgicos α_{1D} truncos (ΔN , sin la región amino terminal, 1-79) y ($\Delta\text{N}-\Delta\text{C}$, sin las regiones amino y carboxilo terminales, $\Delta\text{1-79}$ y $\Delta\text{441-572}$).

Para construir la forma truncada ΔN ($\Delta\text{1-79}$) del receptor α_{1D} adrenérgico humano, se eliminaron los primeros 79 aminoácidos, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como templado al plásmido pcDNA1neo que contenía al RA- α_{1D} humano nativo. El oligonucleótido sentido 5'-TAGCTAGCGACGTGAATGGCACGGCGGCCGTCG-3' y oligonucleótido antisentido 5'-ATAGAATTCTTAAATATCGGTCTCCCGTAGGTTGC-3' fueron utilizados para amplificar la región correspondiente a los primeros 79 aminoácidos, con la incorporación de los sitios de restricción NheI y Eco RI en el extremo 5'- y 3'-, respectivamente. El DNA modificado fue entonces digerido con NheI y EcoRI, purificado y ligado dentro de estos sitios de restricción en el plásmido pCEFL-HA. Para generar el receptor trunco ΔN ($\Delta\text{1-79}$) $\Delta\text{N-C}$ ($\Delta\text{1-79}\Delta\text{441-572}$), se eliminaron del RA- α_{1D} nativo los aminoácidos del 1 al 79 (como se describió arriba) y también del 441 al 572 por PCR, utilizando el oligo sentido 5'-TAGCTAGCGACGTGAATGGCACGGCGGCCGTCG-3' y el oligo antisentido 5'-

ATAGAATTCTCAGGCCCGCCAGTGGTGGCCGTAGACACGC-3' con la incorporación de los sitios NheI y EcoRI en el 5' y en el 3', respectivamente. La PCR se realizó en presencia de DMSO al 3 % (debido al alto contenido de GCs). El producto de PCR fue digerido con NheI y Eco RI, purificado, y ligado dentro de los sitios de restricción NheI y Eco RI del plásmido pCEFL-HA (Ver Anexo I). Los cDNAs obtenidos de ambas construcciones, fueron introducidos por transformación de las células competentes de *E. Coli* cepa DH5 α como a continuación se describe:

-Transformación

- 1) Las células competentes DH5 α y el plásmido pCEFLP-HA, que contenía insertado al receptor α_{1D} adrenérgico humano (ΔN o $\Delta N-C$), fueron mezclados (cada construcción por separado) e incubados en hielo por 10 min, pasado este tiempo se sometieron a un choque térmico de 42 °C por 45 s.
- 2) Inmediatamente después se adicionó 1 mL de medio LB y se dejaron incubando en movimiento (250 rpm) a 37 °C por 1 h.
- 3) La mezcla se centrifugó a 5000 rpm y el botón se resuspendió en 200 μ L de medio LB.
- 4) Las células transformadas se plaquearon en una caja Petri de LB-agar con ampicilina (100 μ g/mL), y se agitó a 37 °C hasta el siguiente día.

-Cultivo bacteriano

- 1) Se colocó una colonia de las células transformadas en 2 mL de medio líquido de LB con ampicilina (100 μ g/mL), manteniéndose en agitación a 250 rpm y a 37 °C por toda la noche.
- 2) El cultivo de la colonia transformante se vació en un matraz de 500 mL, en un volumen de 100 mL del mismo medio, y se incubó hasta el día siguiente.

-Obtención del plásmido

- 1) El cultivo bacteriano anterior se centrifugó a 6000 rpm a 4 °C por 20 min.
- 2) El paquete de bacterias se disolvió en 4 mL del amortiguador P1 o de resuspensión (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM; RNAasa A 100 μ g/mL), y el sobrenadante se eliminó.
- 3) A lo anterior se adicionaron 4 mL de amortiguador P2 o de lisis (NaOH 200 mM, SDS 1 %), se mezcló y se dejó reposando 5 min a temperatura ambiente.

- 4) Después se agregó el amortiguador P3 o de neutralización (3.0 M de acetato de potasio, pH 5.5) agitando ligeramente y se incubó en hielo por 15 min.
- 5) A continuación, el botón bacteriano de cada construcción (del paso 4) se centrifugó a 11,000 rpm y 4 °C durante 30 min; mientras tanto, se equilibró y lavó una columna con 4 mL del amortiguador QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM, pH 7.0; etanol 15 %; Tritón X-100 0.15 %).
- 6) El sobrenadante se pasó a través de un filtro Whatman del No. 4 y se aplicó en una columna previamente equilibrada para la purificación de plásmidos.
- 7) La columna con el sobrenadante fue lavada con 10 mL del amortiguador QC o de lavado (NaCl 1.0 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, etanol 15 %).
- 8) El DNA se eluyó con 5 mL de QF (NaCl 1.25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, etanol 15 %).
- 9) El DNA eluido se precipitó con 3.5 mL de isopropanol, se mezcló y centrifugó a 11,000 rpm por 30 min.
- 10) El DNA precipitado se lavó dos veces con 2 mL de etanol al 70 %, se secó a temperatura ambiente por 12 h y se resuspendió en 300 µL de agua.
- 11) La cantidad de plásmido obtenido de cada construcción se cuantificó y visualizó en un espectrofotómetro Beckman a una longitud de onda de UV a 260 y 280 nm y por geles de agarosa al 1 %.

NOTA: En todas las centrifugaciones se utilizó una centrifuga Sorvall GSA.

La obtención del plásmido de las construcciones truncadas, fue confirmada por secuenciación automatizada del DNA en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La información obtenida de la secuenciación fue corroborada por alineamiento utilizando el programa BLAST y por la digestión con enzimas de restricción; los fragmentos obtenidos por los sitios de corte fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Generación de las líneas celulares que expresan establemente a los receptores adrenérgicos α_{1D} truncados ΔN y $\Delta N-\Delta C$.

Las células Rat-1 silvestres se sembraron en placas de 6 pozos y se mantuvieron a 37 °C y 5 % CO₂ en medio DMEM con 10 % suero fetal bovino y antibióticos.

-Transfección

- 1) Al siguiente día las células fueron lavadas con DMEM sin suero.
- 2) Mientras se hicieron dos mezclas: una contenía al plásmido purificado (1.5 µg) con el receptor α_{1D} humano en 400 µL de Optimem, y la otra mezcla tenía a la Lipofectamina 2000 (15 µL) en 400 µL de Optimem; y se dejaron reposar 5 min. Después ambas mezclas se juntaron e incubaron a temperatura ambiente por 30 min.
- 3) La mezcla del plásmido con la lipofectamina se agregó a las células Rat-1 y se incubaron por 6 h a 37 °C.
- 4) La mezcla de transfección se retiró; las células se lavaron con PBS y se les colocó el medio DMEM con suero al 10 %.
- 5) A las 72 h se cambio el medio por DMEM suplementado con G418 600 µg/mL.

-Selección

- 1) La selección se hizo por dilución limitante, la cual consistió en tratar de crecer una sola célula en un pozo (de una caja de 48), manteniendo el cultivo celular en presencia del antibiótico G418 (600 µg/mL).
- 2) A los dos meses, a las células sobrevivientes se les cambio la concentración de G418 a 300 µg/mL. Las colonias celulares sobrevivientes fueron expandidas.
- 3) Por último, se eligió solo una colonia de las células Rat-1 que expresaron al receptor α_{1D} adrenérgico humano, de cada una de las construcciones truncas del receptor α_{1D} adrenérgico humano. La funcionalidad de cada colonia se obtuvo a través de medir la generación de los segundos mensajeros (calcio intracelular y fosfatos de inositol) al estimular con NA.

Medición de la liberación de calcio intracelular

- 1) Las células con el receptor α_{1D} adrenérgico humano se cultivaron en cajas Petri de 10 cm, hasta que tuvieran una población del 90 % de confluencia.
- 2) Las células se dejaron en ayuno (sin suero) de 12-18 h.
- 3) Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 4 mL Krebs-Hepes-BSA pH 7.4 (Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, KCl 4.75 mM, BSA 0.05 %, glucosa 10 mM, CaCl_2 1.3 mM) con Fura 2-AM (5 μM) por 1 h a 37 °C.
- 4) Las células incubadas con Fura-2AM se lavaron dos veces con PBS, se despegaron con 500 μL de tripsina (por menos de 5 min), se resuspendieron con 10 mL del amortiguador Krebs-Hepes-BSA, se lavaron tres veces por resuspensión y centrifugación (3,000 rpm por 5 min) con el mismo amortiguador. La pastilla celular se llevó a un volumen de 10 mL del mismo amortiguador.
- 5) Para la medición de la liberación de calcio, se colocó 1 mL de las células en suspensión y 1 mL del Krebs en una celda, la cual se puso dentro del espectrofluorómetro (AMINCO-Bowman Serie 2) y se prosiguió a estimular con los tratamientos correspondientes. Las células se mantuvieron en suspensión y agitación a 37 °C durante la obtención de los trazos.
- 6) Los trazos fueron registrados a las siguientes longitudes de onda: 340 nm de excitación y 510 nm de emisión con intervalos de 0.5 segundos. La cuantificación de calcio se obtuvo de la relación de fluorescencia máxima y mínima de acuerdo a la ecuación: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\text{min}})/(R_{\text{max}} - R)][S_f/S_b]$; en donde K_d es la constante de afinidad del Fura-2AM (224 nM); R es la lectura de fluorescencia en unidades arbitrarias; R_{min} = Fluorescencia mínima, determinada al agregar el EGTA 5 mM, y R_{max} = Fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con TritónX-100 al 1 %; S_f y S_b son los coeficientes de proporcionalidad del Fura, libre S_f y unido al Ca^{2+} S_b en la longitud de onda 2 (Grynkiwicz, 1985). Los datos se analizaron con el programa Prim3.0/GraphPad.

Cuantificación de la producción de fosfatos de inositol

1) Las células transfectadas con el receptor α_{1D} humano fueron sembradas en placas de seis pozos; al estar al 100 % de crecimiento se dejaron incubando con 750 μ L de medio DMEM sin inositoles, 1 % de SBF y con 3 μ Ci/mL de [3 H] mio-Inositol por 18 h a 37 °C y a 5 % de CO₂.

2) El día del experimento se retiró el medio a las células por aspiración, fueron lavadas dos veces con PBS y preincubadas por 20 min con 2 mL/pozo de la solución Krebs-Ringer-Hepes LiCl₂ 20 mM pH 7.4 (Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KCl, 1.3 mM CaCl₂) a 37 °C; a continuación se estimuló con 20 μ L NA y/o BMY7378 10 μ M por 15 min.

3) La reacción se detuvo con 300 μ L de ácido perclórico frío al 30 %. Las células se rasparon con un gendarme, se pasaron a tubos de ensayo, donde se neutralizaron con 1 mL de una solución de KOH 1.5 M y Hepes 75 mM, y se les ajustó el pH entre 7.3-7.8. Posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 min en una centrífuga Beckmann.

4) Los fosfatos de inositol totales fueron separados por cromatografía de intercambio aniónico, utilizando una columna con 1.5 mL de resina hidratada (Dowex AG1-X8), previamente equilibrada con el amortiguador de regeneración (formato de amonio 2 M y ácido fórmico 0.1 M). Los sobrenadantes se pasaron por la columna aplicando amortiguadores de diferente fuerza iónica (después de colocar cada amortiguador, se hizo un lavado con agua). Se aplicó primero el amortiguador GPI (borato de sodio 5 mM y formato de sodio 180 mM), y después se eluyeron los fosfatos de inositol totales con otro amortiguador (ácido fórmico 0.1 M y formato de amonio 1 M) (modificado de Berridge, 1983).

5) Las muestras se colectaron en viales, se les adicionó 5 mL de tritosol (PPO, xileno 60 %, tritón 25.7 %, etilenglicol 3.7 % y etanol 10.6 %) y se cuantificaron como DPM (desintegraciones por minuto) en el contador de centelleo Beckmann LS600SE.

Preparación de las membranas

1) Las células Rat-1 que expresan al receptor α_{1D} humano se sembraron en seis cajas Petri (10 cm). Una vez confluentes fueron lavadas dos veces con PBS frío e incubadas 20 min en 1 mL de una solución de lisis pH 7.5 (Hepes 20 mM; EDTA 1 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, β -glicerofosfato 10 mM, MgCl_2 2 mM, inhibidores de proteasas (leupeptina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bacitracina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibidor de tripsina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y PMSF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 4°C.

2) Las células fueron raspadas con un gendarme y puestas en un homogenizador de vidrio previamente enfriado. La ruptura celular consistió en homogenizar los lisados celulares, con un vástago de teflón adaptado a un taladro, subiendo y bajando 40 veces (todo se hizo sobre hielo).

3) El homogenado celular se colocó en tubos corex de 15 mL y se centrifugó a 3,800 rpm por 20 min a 4 °C.

4) El sobrenadante se pasó a otro tubo y el botón se volvió a homogenizar y a centrifugar (como en el paso 2).

5) Los sobrenadantes se centrifugaron a 11,000 rpm a 4 °C por 20 min.

6) Las membranas se resuspendieron en 250 μL del amortiguador Tris 50 mM- MgCl_2 10 mM pH 7.5.

7) La concentración de proteína membranal (mg/mL) se determinó por el método modificado de Lowry (1951), utilizando albúmina bovina como estándar.

Ensayo de unión a radioligando

1) Las membranas plasmáticas (25 μg), aisladas previamente, se incubaron con diferentes concentraciones del radioligando [^3H]-tamsulosina, y en presencia o ausencia de una concentración fija del antagonista selectivo de los receptores α_{1D} adrenérgicos, el BMY7378 10 μM , en un volumen final de 250 μL del amortiguador de unión (Tris 50 mM y MgCl_2 10 mM, pH 7.5) por 1h en un baño de agua a 37 °C con agitación constante.

2) La reacción se detuvo con 5mL del amortiguador de unión frío y a continuación, las muestras se filtraron en el aparato Brandell utilizando filtros GF/C. Los filtros se lavaron dos veces con el mismo amortiguador, secados y colocados en viales de vidrio con líquido de centelleo o tritosol.

3) La radiactividad de las muestras se cuantificó en un contador de centelleo Beckmann LS600SE. La unión específica fue > 90 % del total de la unión. La unión no específica fue determinada en presencia de BMY7378. El cálculo y el análisis para determinar la Kd y la Bmax fueron realizados con los programas EBDA de Biosoft-Elsevier (Cambridge, UK) y Prim3.0/GraphPad.

Fotomarcaje

1) Las membranas plasmáticas (50 µg) se disolvieron en el amortiguador de fotomarcaje (Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, adicionado con inhibidores de proteasas) e incubadas con [¹²⁵I]-azido-iodo-prazosina 6 nM con o sin BMY7378 10 µM, en un volumen final de 100 µL (en tubos eppendor), manteniéndose durante 1h en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación constante.

2) La reacción se detuvo con 700 µL del amortiguador y las muestras fueron expuestas a radiación UV con una $\dot{E}=6000 \mu\text{J}$ por 3 min en el aparato Stratalinker de Stratagene.

4) Las membranas se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min en la microfuga a 4 °C, se aspiró y desechó el sobrenadante. Una parte de las muestras se usaron para detectar el total de los receptores fotomarcados (tratados a partir del paso 5 en adelante), y las otras muestras se inmunoprecipitaron como se menciona a continuación:

5) El botón membranal fue solubilizado en 500 µL del amortiguador de fotomarcaje, con tritón 1.5 % e incubado en hielo por 1h. Pasado el tiempo las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C por 15 min, para la inmunoprecipitación, el sobrenadante se colocó en tubos eppendor con la proteína A o G sefarosa y se dejaron toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, las perlas de sefarosa se lavaron con el amortiguador de lavado

(Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaF 10 mM, SDS 0.05 % y tritón x-100 1.0 %, pH 7.2) por resuspensión y centrifugación (13,000 rpm, 15 min.).

6) El complejo del receptor inmunoprecipitado fue solubilizado con 25 µL de la solución SDS 10 %-Urea 8 M y con 25 µL de Laemli 2x y 5 % de β-mercaptoetanol (Tris 1 M pH 6.8, glicerol 20 %, SDS 0.04 % y azul de bromofenol 0.01 %). A continuación las muestras se hirvieron por 5 min a ebullición y se centrifugaron por 5 min a 13,000 rpm.

7) Las muestras se corrieron en un gel de electroforesis (PAGE-SDS) al 7.5 %, bajo condiciones de reducción. Posteriormente los geles se colocaron en papel celofán dulce y se secaron mediante calor y vacío durante 2 h.

7) Los geles se expusieron en una placa de autorradiografía y fueron analizados empleando el programa Image Quant del aparato Thyphoon del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics.

* Cabe mencionar que, en las condiciones empleadas, la eficiencia de inmunoprecipitación de los receptores fotomarcados fue del 17±3 % utilizando el anticuerpo policlonal, y de 4±1 %, con el anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítipo HA.

Ensayo de fosforilación

1) Las células que expresan al receptor α_{1D} humano se sembraron en placas de seis pozos y se dejaron llegar a confluencia. Posteriormente se incubaron con el medio de cultivo DMEM sin suero y sin fosfatos por toda la noche dentro de una incubadora a 37 °C.

2) Al día siguiente las células se marcaron con [³²P] Pi (50 µCi/mL) por 3 h a 37 °C.

3) Las células se estimularon con los tratamientos correspondientes, y se paró la reacción aspirando el medio, colocándolas sobre hielo y lavándolas dos veces con PBS frío.

4) Después se les agregó 500 µL del amortiguador de lisis pH 7.4 (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM pH 8.0; Tritón x-100 1.5 %, pirofosfato de sodio 10 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 100 µM, β-glicerofosfato 10 mM, PMSF 100 µg/mL, fosfo-serina 1 mM, fosfo-tirosina 1 mM, fosfo-treonina 1 mM, inhibidores de proteasas) y se incubaron 1 h a 4°C.

5) Los lisados se recogieron de cada pozo, se colocaron en tubos eppendor de 1.5 mL, y se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C en la microfuga.

6) Los sobrenadantes se colocaron en tubos eppendor que contenían a la proteína A (20 µL) o G (25 µL) sefarosa y un anticuerpo dirigido contra la región carboxilo terminal del receptor α_{1D} (5 µL) o contra la hemaglutinina (HA) (10 µL), respectivamente; se colocaron en una caja de acrílico y se dejaron en agitación por 24 h a 4°C.

7) Después se hicieron dos lavados (resuspensión y centrifugación a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C) con el amortiguador de lavado frío (Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaF 10 mM, SDS 0.05 % y tritón x-100 1.0 %, pH 7.2); entre cada lavado las muestras se agitaron vigorosamente y el sobrenadante se eliminó por aspiración.

8) A los receptores fosforilados e inmunoprecipitados se les agregó la solución de carga (Laemli 2x con 5 % de β -mercaptoetanol (Tris 1 M pH 6.8, glicerol 20 %, SDS 0.04 % y azul de bromofenol 0.01 %) (25 µL) y SDS al 10 % con urea 8 M (25 µL)); después las muestras se hirvieron por 5 min y se centrifugaron a 11,000 rpm durante otros 5 min.

9) Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida al 7.5 % o 10 % en condiciones desnaturalizantes.

10) Los geles se acomodaron sobre celofán dulce, se secaron y expusieron en una placa de autorradiografía del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics.

11) La visualización y detección se realizó empleando el programa Image Quant del aparato denominado Thyphoon del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics.

Análisis de fosfoaminoácidos

1) El análisis de fosfoaminoácidos consistió en una fosforilación (descrita anteriormente), con la siguiente variante: las células se crecieron a confluencia en cajas Petri (10 cm) y se marcaron con 200 µCi/mL de [^{32}P] Pi; después se estimularon con los tratamientos correspondientes e inmunoprecipitaron con 20 µL del anticuerpo dirigido contra la región carboxilo terminal del receptor α_{1D} y 40 µL de proteína A sefarosa.

- 2) Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida al 10 %, y se transfirieron a membranas PVDF, previamente humedecidas en metanol al 100 %. La transferencia se realizó en presencia del amortiguador (Tris 12 mM, glicina 9.7 mM, 20 % de metanol).
- 3) La membrana con el receptor fosforilado y transferido a la membrana PDVF, fue colocada en una placa de autorradiografía del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics. La banda correspondiente al receptor se identificó y se cortó sobreponiendo la membrana PVFD y la imagen visualizada por el programa Image Quant, en el aparato Thyphoon del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics.
- 4) La membrana de PVDF con el receptor se humedeció en metanol 100 %, se lavó con agua desionizada y se colocó en criotubos; después se agregaron 200 μ L de HCl 6 N, se pasaron por el gas desprendido del nitrógeno líquido y se hidrolizaron en un bloque térmico a 110 °C durante 1h.
- 5) Posteriormente las muestras se centrifugaron al máximo (13,000 rpm) y el sobrenadante se pasó a tubos eppendor nuevos donde fueron liofilizados al vacío, por varias horas en el aparato speed-vac;
- 6) El botón de las muestras se disolvió en 6 μ L del amortiguador pH 1.9 (ácido fórmico 2.2 % y ácido acético glacial 7.8 %) con los estándares de los fosfoaminoácidos (p-serina, p-tirosina y p-treonina, 25 nmol c/u);
- 7) Las muestras se colocaron en un mismo punto (1 mm) a una distancia de 2 cm de la orilla (del lado del cátodo), y esperando a que se secara entre cada aplicación (de 0.5 μ L c/u) sobre placas de celulosa hasta completar 3 μ L.
- 8) La electroforesis de 2D se corrió en una cámara de Hoefer SuperSub: la primera dimensión se realizó con el amortiguador pH 1.9 (ácido fórmico 2.2 %-ácido acético glacial 7.8 %) por 25 min a 750 V, se enjuagó la cámara y se puso el amortiguador para la segunda dimensión pH 3.5 (piridina 0.5 %-ácido acético glacial 5 %) a 750 V por 15 min. La conexión entre la fase móvil (amortiguador) y la fija (placa celulosa) fue a través de dos puentes de papel Whatmann de 3 MM doble (20 x 10 cm), colocados a 5 mm del punto de aplicación; se colocó una placa de vidrio sobre ellos.

9) Posteriormente las placas se secaron a 65 °C. La visualización de los fosfoaminoácidos fríos (sin marca) se realizó rociando las placas con ninhidrina 0.25 % en acetona y dejándolas secar 10 min a 65 °C; se expusieron en una placa de autorradiografía del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics (Metodología basada en Boyle et al, 1991; Vázquez-Prado et al, 1997)

10) La detección de los fosfoaminoácidos fosforilados (marcados) fue empleando el programa Image Quant del aparato Thyphoon del sistema Phosphor Imager, de Molecular Dynamics.

Análisis Estadístico

La comparación estadística entre los grupos se realizó por el análisis de varianza con la prueba de Newman-Keuls utilizando el programa GraphPad Prism 4.

Parte de los resultados mostrados en esta tesis corresponden al trabajo publicado:

Naunyn-Schmied Arch Pharmacol (2009) 380:99–107

“Signaling properties of human α_{1D} -adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: intrinsic activity, agonist-mediated activation, and desensitization”

C. Ekaterina Rodríguez-Pérez & M. Teresa Romero-Ávila & Guadalupe Reyes-Cruz & J. Adolfo García-Sáinz.

IX.-RESULTADOS

Funcionalidad de las formas truncas del receptor α_{1D} adrenérgico humano

El papel del carboxilo terminal en la desensibilización del receptor α_{1D} adrenérgico humano fue analizado utilizando las construcciones truncadas del receptor ΔN (sin el amino terminal) y $\Delta N-\Delta C$ (sin el amino y sin el carboxilo terminales) (Fig. I).

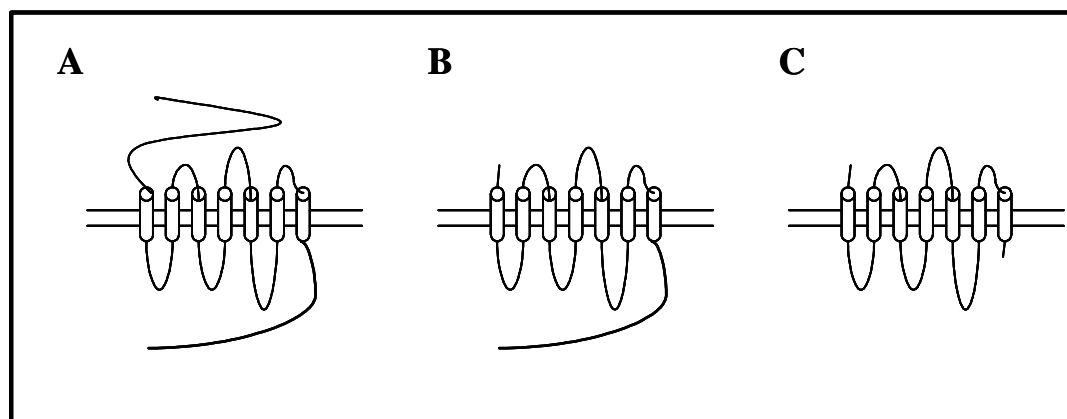


Figura I.- Esquema del receptor α_{1D} adrenérgico humano y sus formas truncas. En (A) el receptor completo, los receptores truncos: ΔN , sin los primeros 79 aminoácidos del amino terminal (B), y $\Delta N\Delta C$, sin los primeros 79 aminoácidos y sin los últimos 134 aminoácidos del carboxilo terminal.

Los receptores α_{1D} se acoplan a la vía de señalización del sistema de recambio de los fosfoinosítidos/calcio, por lo que la funcionalidad de los receptores truncos fue analizada por la capacidad de los RA- α_1 de generar los segundos mensajeros: Ca^{2+} y fosfatos de inositol, en respuesta a NA. La estimulación con 10 μM de NA (Fig. IIA y IIC) indujo un incremento inmediato en la $[Ca^{2+}]_i$ que fue similar en ambas construcciones. Cuando las células se incubaron con el BMY7378, antagonista selectivo del subtipo α_{1D} , se bloqueó la respuesta de la NA, de forma dependiente de la concentración (datos no mostrados). Además del bloqueo, se observó en ambas construcciones una disminución en el nivel basal al estimular con el BMY7378, es decir, tuvo un comportamiento de agonista inverso, característica que ha sido observado para este subtipo (García-Sáinz y Torres-Padilla, 1999) (Fig. IIB y IID).

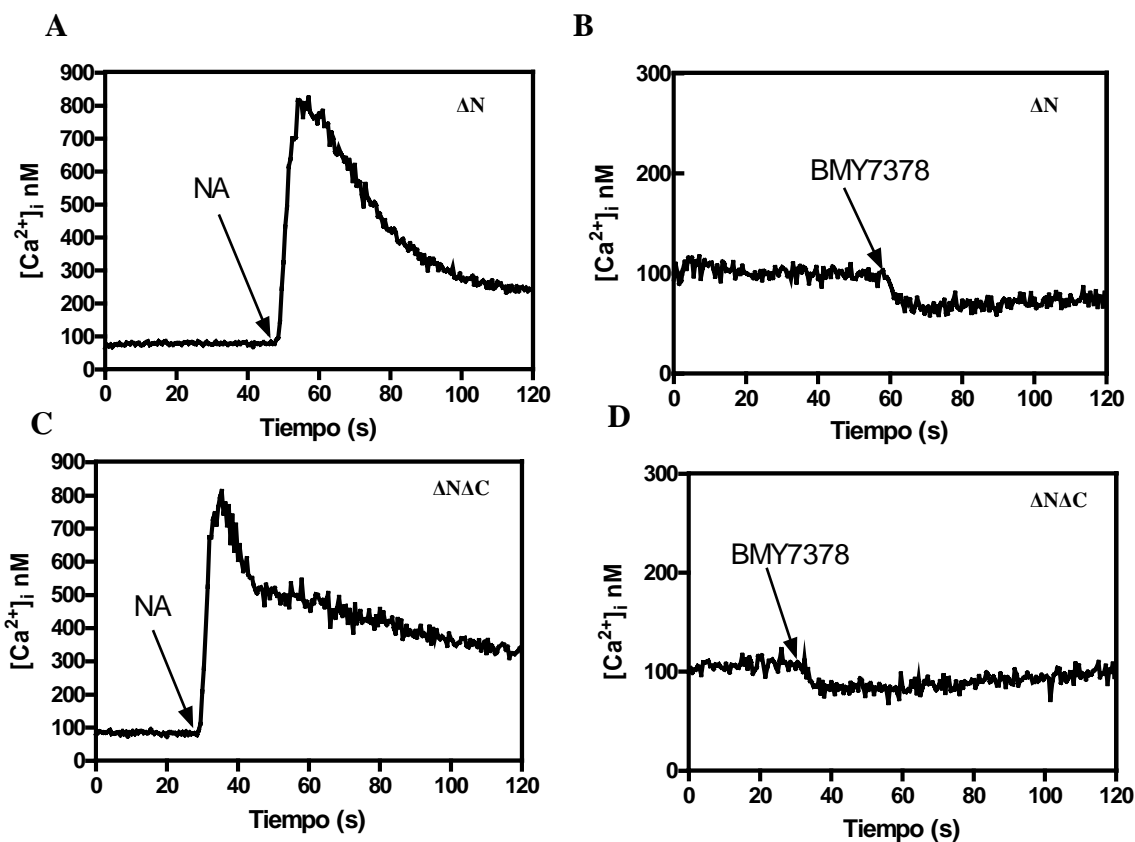


Figura.-II Efecto de la NA y el BMY7378 en la liberación de calcio intracelular. Trazos representativos de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ de los fibroblastos que expresan establemente al RA- α_{1D} , ΔN (A y B) o el RA- α_{1D} truncado en ambos extremos $\Delta N\Delta C$ (C y D) estimulados (flecha) con NA 10 μM o con BMY7378 10 μM . La respuesta fue similar en ambas construcciones ($p < 0.001$ vs basal). Los trazos fueron directamente exportados del espectrofluorómetro y son representativos de al menos seis experimentos.

La producción de fosfatos de inositol tuvo una tendencia similar a la del calcio en ambas construcciones, esto es, al estimular a las células con NA aumentó el nivel de los fosfatos de inositol totales, y una ligera disminución en el nivel basal e inhibición al tratar con BMY7378 sobre la respuesta de NA (Fig. IIIA y IIIB). Las formas truncas del receptor α_{1D} muestran que son funcionales y que se acoplan eficientemente al sistema de transducción (Fig. III).

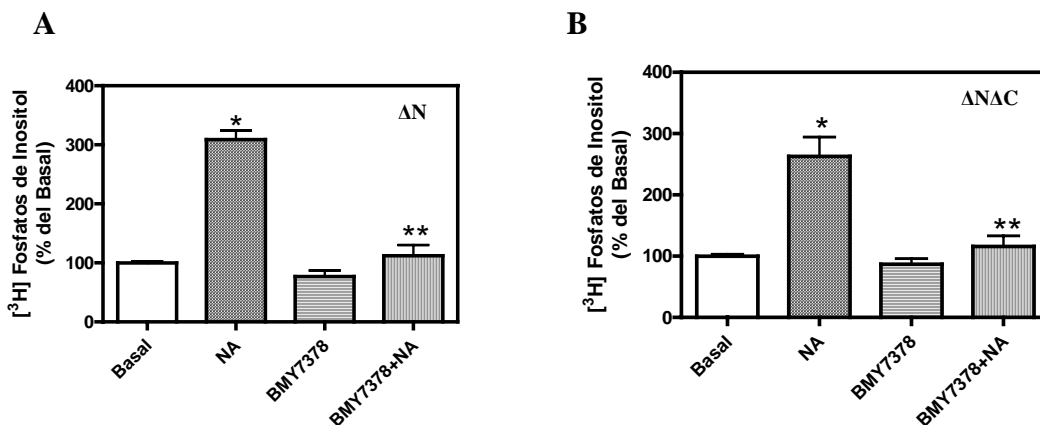


Figura.-III Producción de fosfatos de inositol.

El efecto de la NA y el BMY7378 sobre la producción de los fosfatos de inositol fue cuantificado en las construcciones ΔN (A) y $\Delta N\Delta C$ (B). Los datos son el promedio \pm D.E. de seis experimentos independientes. El basal representa a las células sin estímulo y su respuesta fue considerada como el 100 %.* $p < 0.001$ vs. Basal, ** $p < 0.001$ vs. NA.

Expresión y Afinidad del receptor α_{1D} adrenérgico humano

El número de receptores expresados y su afinidad en las construcciones de los receptores trancos, fue determinado utilizando ensayos de unión a radioligando en membranas. La unión del ligando marcado [3H]-tamsulosina a los receptores fue saturable para las dos formas trancas (Fig. IVA y IV4B), como se puede observar en la gráfica de la curva que es hiperbólica. La curva muestra la relación entre tamsulosina unida contra la tamsulosina total. En el recuadro se muestra que la gráfica de Scatchard es lineal, lo que indica una población homogénea de receptores.

Al analizar los datos se encontró que las afinidades oscilan alrededor de 0.3 y 0.5 nM que corresponden al rango de la K_D esperada para este subtipo. Además, se verificó que al eliminar los primeros 79 aminoácidos del receptor α_{1D} adrenérgico humano, la expresión del receptor aumenta (Pupo et al, 2003) aproximadamente unas 50 veces, que el receptor completo con una B_{max} de ~ 40 fmol/ mg de proteína (García-Sáinz et al, 2004) en el mismo tipo celular.

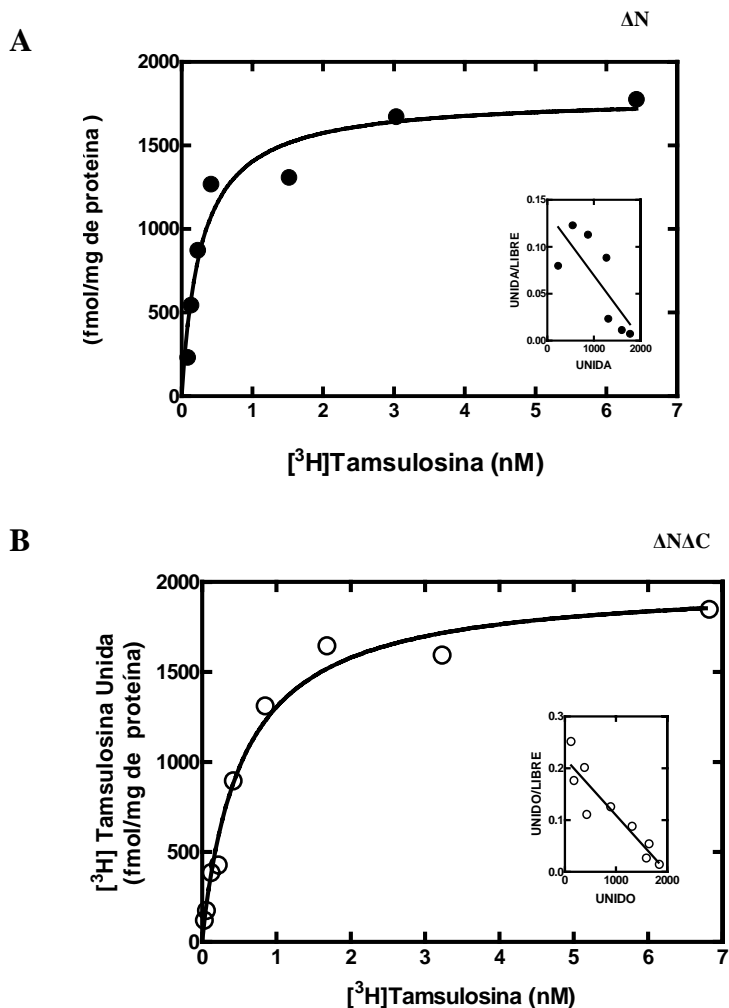


Figura.-IV Curvas de la saturación con tamsulosina. Las membranas fueron aisladas de las células Rat-1 transfectadas con cada una de las construcciones y fueron incubadas con o sin BMY7378 (10 μM) y con varias concentraciones de $[^3\text{H}]$ -tamsulosina. La cantidad de receptores para la forma ΔN (panel superior) fue de 1995 ± 260 fmol/mg proteína y para $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ (panel inferior) de 1750 ± 265 fmol/mg proteína. Las constantes de afinidad fueron de 0.39 ± 0.07 nM y 0.53 ± 0.10 nM respectivamente. Las gráficas son representativas de cuatro experimentos con preparaciones de

Detección de las construcciones del receptor adrenérgico α_{1D} humano

Por marcaje de fotoafinidad se confirmó que las formas trunca expresadas en las células Rat-1 corresponden al subtipo receptor α_{1D} . El ensayo se realizó con membranas de las células Rat-1 que fueron transfectadas con cada una de la forma trunca del receptor. Las preparaciones de membranas fueron incubadas con $[^{125}\text{I}]$ -aril azido prazosina, antagonista irreversible unido a un compuesto sensible a la luz, y en presencia o en ausencia BMY7378 (agente selectivo del subtipo α_{1D}) para asegurar que la unión fuera específica. Se puede

observar en la Fig. VA que el receptor ΔN (flecha superior) presenta una masa molecular de 65 kDa y la forma $\Delta N\Delta C$ (flecha inferior) de 45 kDa; además, en presencia del BMY7378 no se observa la banda correspondiente al receptor, lo que indica la preferencia por este antagonista selectivo. También se observó una banda inferior de ~50 kDa en ΔN y una de ~35 kDa en $\Delta N\Delta C$ (no observada en este gel), cuyo marcaje fue casi totalmente bloqueado por BMY7378, estas bandas pueden ser fragmentos proteolíticos del receptor. Además, se probó la capacidad para inmunoprecipitar y la especificidad de dos anticuerpos para el receptor (Fig. VB). El anticuerpo dirigido contra la región carboxilo del receptor adrenérgico de rata, en el carril 1, se observa que este anticuerpo inmunoprecipita mejor que el anticuerpo monoclonal comercial (de Covance) que está dirigido contra el epítipo de hemaglutinina (HA), carriles 2 y 4.

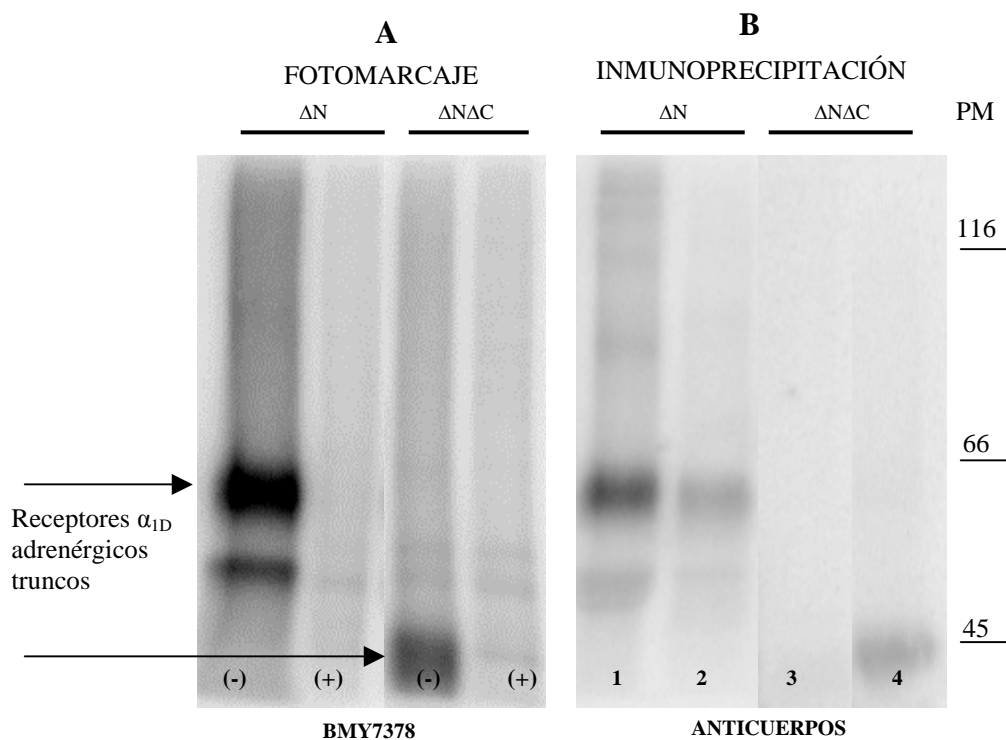


Figura V.- Fotomarcaje e inmunoprecipitación de los receptores α_{1D} adrenérgicos truncos. Estos experimentos se realizaron con membranas de células Rat-1 con el receptor sin el amino terminal (ΔN), sin el carboxilo y sin el amino ($\Delta N\Delta C$). Para el fotomarcaje (A) se utilizó [125 I]-aril azido prazosina (6 nM) en presencia (+) o ausencia (-) de BMY7378 (10 μ M). La inmunoprecipitación (B) con un anticuerpo dirigido contra el carboxilo terminal (1 y 3) y contra la bandera de HA de Covance (2, 4). Con las flechas se señalan las dos formas truncas del receptor. Autorradiografía representativa de cuatro experimentos independientes.

Desensibilización Homóloga

Los tres subtipos de receptores α_1 adrenérgicos son sensibles a la desensibilización por la activación de la PKC, por lo que se analizó la capacidad del tetradecanoil forbol acetato (TPA), un éster de forbol activador de esta cinasa, para atenuar la respuesta provocada por la NA al estimular a los receptores truncados. Las células respondieron a la NA de forma dependiente de la concentración, incrementando 5-6 veces la concentración de calcio intracelular sobre el nivel basal, con una EC_{50} de 0.3-1 μM para el receptor ΔN y una EC_{50} 0.15-0.50 μM para $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ (Fig. VIA y VID). El estímulo con TPA en la liberación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desensibilizó de manera concentración-dependiente (sin cambios en la EC_{50}), y sin abatirse totalmente el efecto de NA (Fig. VIC y VIF) en ambas construcciones. La activación de la PKC indujo una disminución inmediata en la concentración basal del calcio (Fig. VIB y VIE), es decir, bloqueó la actividad adrenérgica intrínseca del receptor al igual que el antagonista BMY7378.

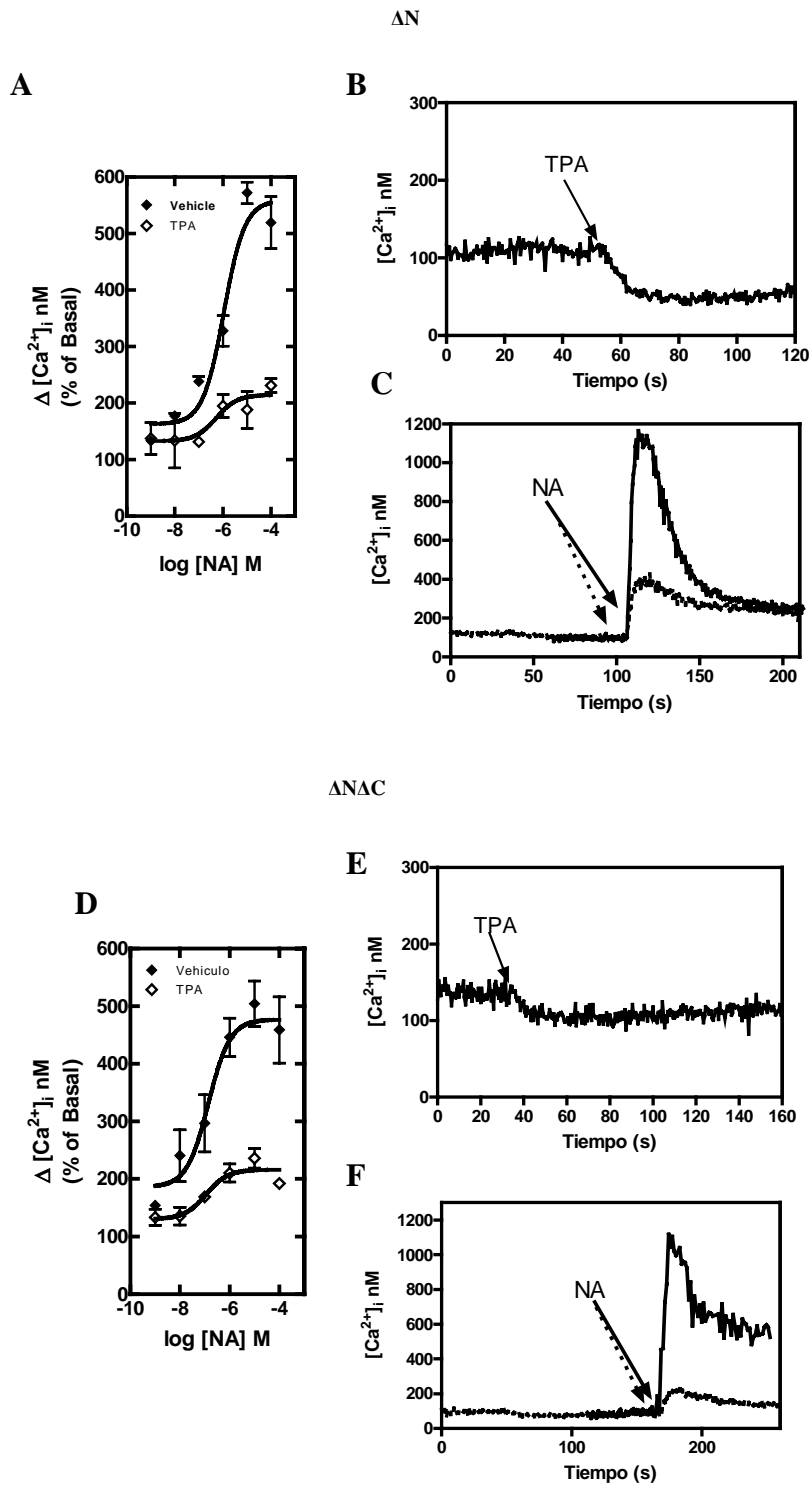


Figura.-VI Efecto del TPA en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$).

Liberación de $[Ca^{2+}]_i$ de las células que expresan las diferentes formas truncas del receptor α_{1D} humano en (A, B y C) ΔN y en (D, E y F) $\Delta N\Delta C$. En el panel izquierdo se muestran las curvas concentración-respuesta a NA en ausencia (\bullet) y en presencia de TPA 1 μM (\circ) por 15 min. En el panel derecho se muestran los trazos representativos al estimular con NA 10 μM y con TPA 1 μM o preincubados 15 min con TPA 1 μM más NA (línea punteada) ($p < 0.001$ vs Basal). Las células fueron cargadas con Fura-2AM y la $[Ca_2]_i$ se cálculo por cambios en la fluorescencia.

Estos hallazgos fueron confirmados por la determinación experimental de fosfatos de inositol totales (Fig. VIIA y VIIB). La NA incrementó la producción de fosfatos de inositol. Estas acciones fueron claramente bloqueadas por la activación de la PKC con TPA.

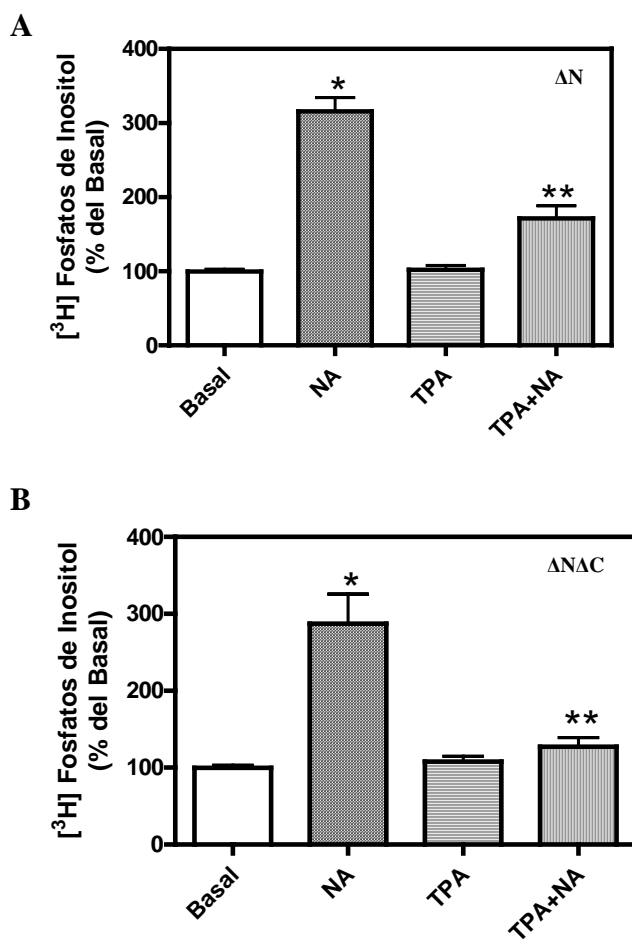


Figura.-VII Producción de fosfatos de inositol.

El efecto de la NA y el TPA fue cuantificado en cada construcción, ΔN (A) y ΔNAC (B). Los datos son el promedio \pm D.E. de seis experimentos independientes. El basal representa a las células sin estímulo y su respuesta fue considerada como el 100%. * $p < 0.001$ vs. Basal, ** $p < 0.001$ vs. NA.

Los experimentos de marcaje metabólico con [³²P] Pi de ambas construcciones fueron realizados para detectar a los receptores fosforilados, y si ésta fosforilación es incrementada por la NA y el TPA. Los receptores ΔN se inmunoprecipitaron con el anticuerpo policlonal generado contra carboxilo terminal y con el anticuerpo monoclonal

anti-HA; y en ambas construcciones se observó una fosforilación en el estado basal, la cual se incrementó al estimular con NA o TPA (Fig. VIII panel superior). La fosforilación del ΔNAC fue demostrada utilizando el anticuerpo contra HA, observándose una fosforilación basal que también fue incrementada en presencia de NA o TPA (Fig. VIII, panel inferior), aunque la magnitud del incremento fue menor.

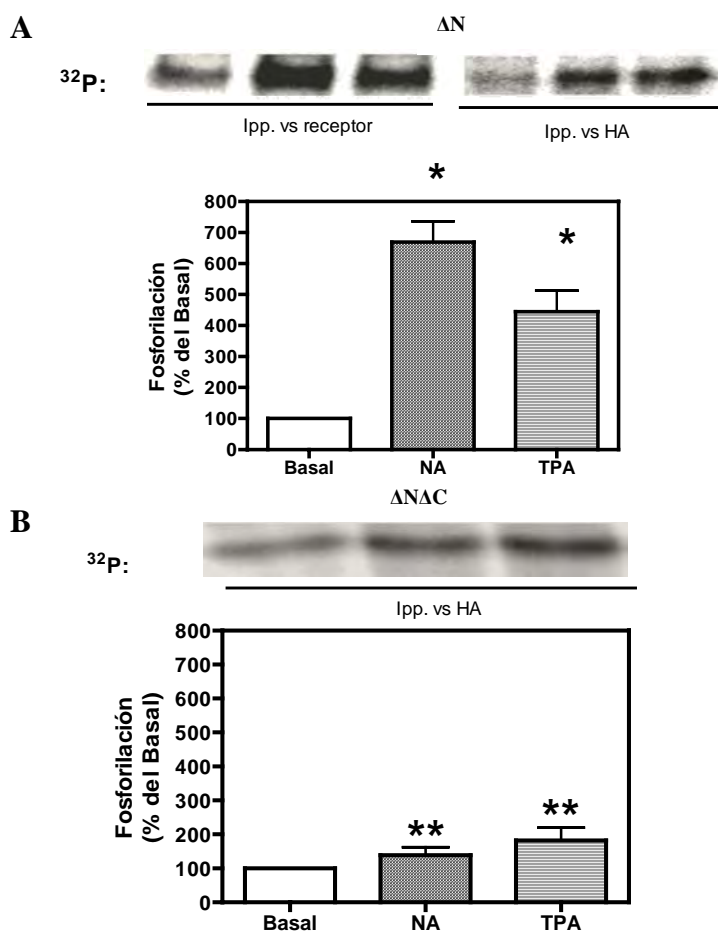


Figura VIII.- Fosforilación del receptor α_{1D} adrenérgico humano. Células Rat-1 con el receptor ΔN (A) y ΔNAC (B). Las células fueron estimuladas con NA 10 μM o con TPA 1 μM por 5 min. Las barras son el promedio y las líneas verticales representan la D.E. de cinco experimentos usando diferentes preparaciones. La autorradiografía es la demostrativa de los efectos para cada tratamiento. * $p < 0.001$ vs. Basal, ** $p < 0.05$ vs. Basal.

De acuerdo al análisis de fosfoaminoácidos del RA- α_{1D} ΔN inmunoprecipitado y fosforilado, se observa (Fig. IX) una fuerte señal en la fosfoserina tanto al estimular con

NA y TPA como en el nivel basal. La fosforilación en fosfotreoninas y fosfotirosinas no fue evidente bajo nuestras condiciones experimentales, aunque no se descartaría la participación de la fosfotreonina que ligeramente se observa marcada, pero no es suficientemente claro ni consistente.

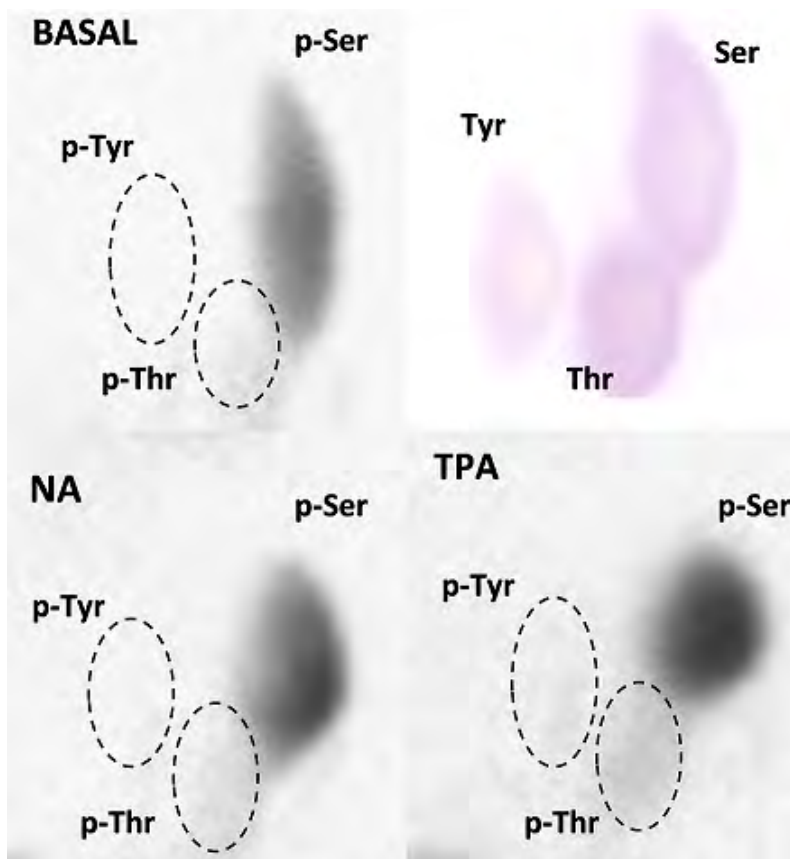


Figura IX.- Determinación de los fosfoaminoácidos del receptor α_{1D} adrenérgico humano. Autorradiografía representativa de los fosfoaminoácidos marcados con 200 $\mu\text{Ci/mL}$ de $[^{32}\text{P}] \text{Pi}$ (izq) y placa de celulosa donde se detectan los aminoácidos con ninhidrina (der), en estado basal y tratados con NA y TPA.

*Desensibilización Heteróloga**

Existe evidencia que los receptores α_{1B} adrenérgico son fosforilados y desensibilizados por otros GPCRs y RTKs, pero debido a la expresión membranal deficiente del subtipo α_{1D} no se había estudiado hasta ahora la comunicación entre estos receptores.

Los receptores a los factores de crecimiento pertenecen a familia de los RTKs. Entre los que se analizó su participación en la desensibilización del receptor α_{1D} adrenérgico, están los receptores de: EGF, PDGF, IGF-I e insulina. La respuesta adrenérgica fue disminuida claramente al preincubar previamente con los factores de crecimiento, en ambas construcciones (Fig. X). La disminución de la respuesta adrenérgica corresponde a un 50% en presencia EGF, IGF-I e insulina, y un 60% con PDGF. Los factores de crecimiento no tuvieron efecto en la liberación de calcio intracelular (datos no mostrados).

La activación de otros receptores endógenos pertenecientes a los GPCRs fue analizada, observándose una disminución en la respuesta a NA al pretratar con endotelina (ET), bradicinina (BK), ácido lisofosfatídico (LPA) y esfingosina-1-fosfato (S1P). Las construcciones ΔN y $\Delta N\Delta C$ tienen un comportamiento similar como se observa en la (Fig. XI).

*NOTA: Algunos datos aún no están publicados

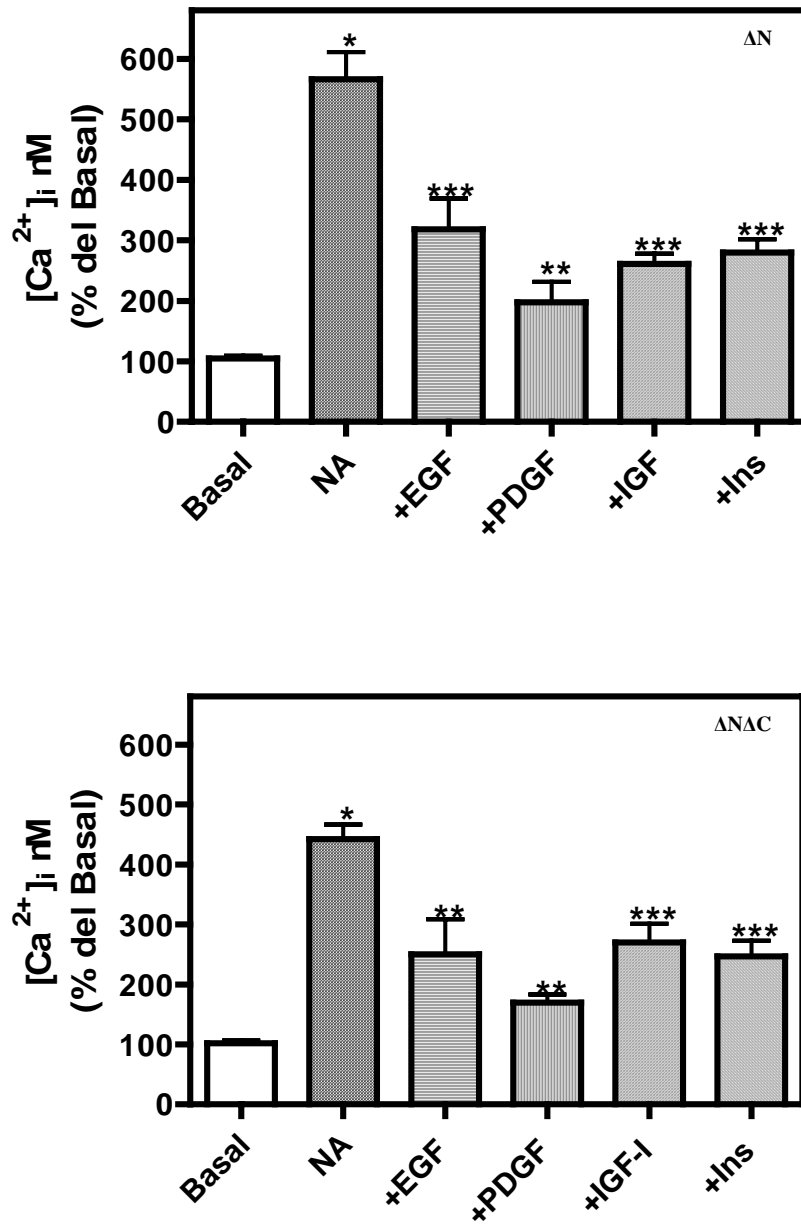


Figura. X. Efecto de los factores de crecimiento sobre la respuesta a NA. La liberación de $[Ca^{2+}]_i$ de las células que expresan las diferentes formas truncas del receptor α_{1D} humano ΔN (panel superior) y $\Delta N\Delta C$ (panel inferior). Las células fueron incubadas en ausencia de cualquier agente (basal) o con NA 10 μM o preincubadas 15 min con EGF 100 ng/mL, PDGF 50 ng/mL, IGF-I 100 ng/mL o Insulina 100 ng/mL y después se adicionó 10 μM . Las barras son el promedio y las líneas verticales representan la D.E. de tres experimentos usando diferentes preparaciones. * $p < 0.001$ vs. Basal, ** $p < 0.001$ vs. NA, *** $p < 0.01$ vs NA en ΔN ; * $p < 0.001$ vs. Basal, ** $p < 0.001$ vs. NA *** $p < 0.01$ vs NA en $\Delta N\Delta C$.

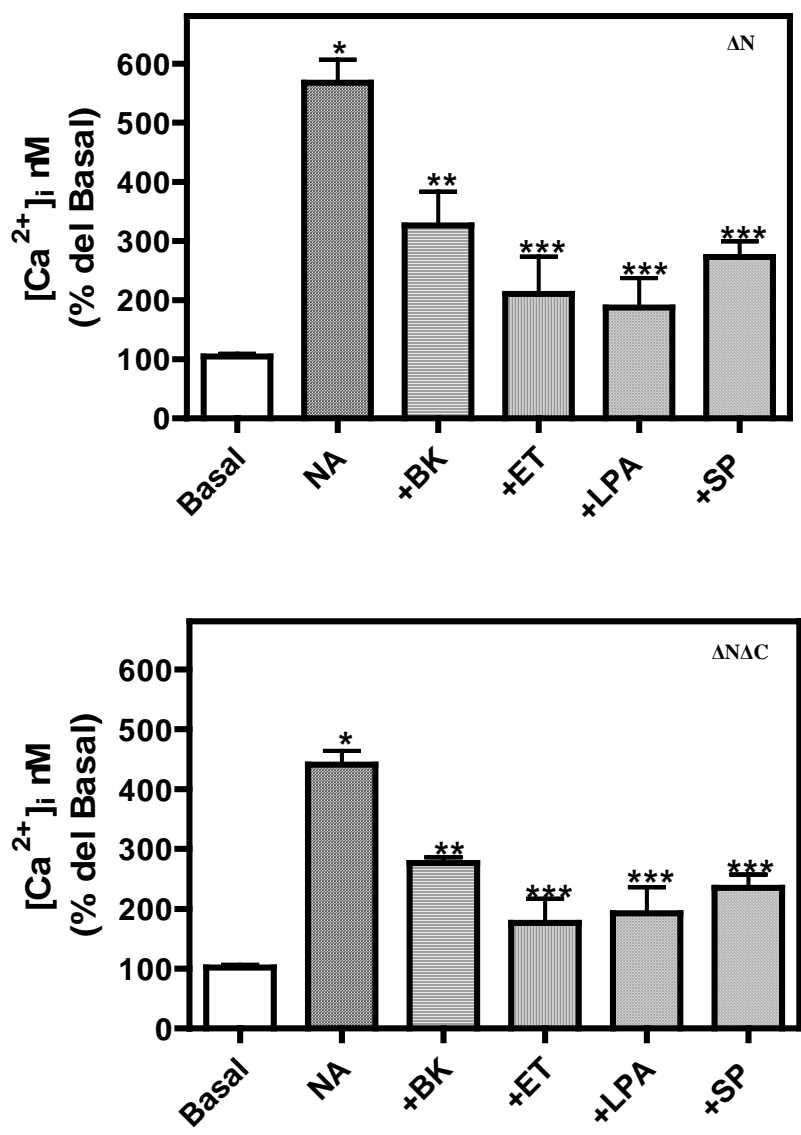


Figura. XI. Efecto de la Bradicinina, Endotelina, LPA y Esfingosina-1 fosfato sobre la respuesta a NA. La liberación de $[Ca^{2+}]_i$ de las células que expresan las diferentes formas truncas del receptor α_{1D} humano ΔN (panel superior) y $\Delta N\Delta C$ (panel inferior). Las células fueron incubadas en ausencia de cualquier agente (basal) o con NA 10 μM o preincubadas 15 min con BK 100 nM, ET 100 nM, LPA 1 μM o SP 100 nM y después se adicionó 10 μM de NA. Las barras son el promedio y las líneas verticales representan la D.E. de tres experimentos usando diferentes preparaciones. *p < 0.001 vs. Basal, **p < 0.01 vs. Basal, *** p < 0.001 vs NA en ΔN ; *p < 0.001 vs. Basal, **p < 0.05 vs. NA, *** p < 0.001 vs NA en $\Delta N\Delta C$.

X.-DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la participación del carboxilo terminal en la señalización del RA- α_{1D} humano. Hasta el momento no se tenía información sobre el papel del carboxilo terminal en la desensibilización del RA- α_{1D} , por tal motivo en el presente trabajo se eliminó gran parte de esta región. La construcción del RA- α_{1D} truncado en el amino terminal (ΔN) fue indispensable para comparar los cambios en el receptor carente del carboxilo terminal ($\Delta N\Delta C$), debido a que el nivel de expresión del RA- α_{1D} humano nativo es extremadamente bajo, tanto endógenamente como en sistemas de sobreexpresión. () En las construcciones del RA- α_{1D} truncadas utilizadas en este trabajo se logró obtener un nivel de expresión mucho mayor y de magnitud similar, observándose un aumento en el número de sitios de unión (2pmol/mg de proteína membranar) en relación con el receptor nativo (40 fmol/mg de proteína) (García-Sáinz et al, 2004) sin que se altere la afinidad por el radioligando [3H]-tamsulosina.

Los RA son receptores de superficie celular que al ser activados por sus ligandos son internalizados, se ha visto que el RA- α_{1D} se localiza mayoritariamente en vesículas intracelulares en ausencia del agonista a diferencia de los otros dos subtipos que se encuentran preferencialmente en la membrana plasmática (Chalothorn et al, 2002; McCune et al, 2000). La localización peculiar del RA- α_{1D} ha sido atribuida al extremo amino terminal, al intercambiar esta región con otros receptores se observa una disminución en la densidad membranar de estos (Hague et al, 2004a). La truncación del amino terminal incrementa la traslocación a la membrana plasmática (Petrovska et al, 2005; Pupo et al, 2003) y nuestros resultados apoyan que efectivamente la región amino terminal contiene determinantes estructurales que intervienen en su localización celular.

Asimismo, ambas construcciones presentaron un acoplamiento adecuado al sistema de transducción de la señal, que se reflejó en la elevación de la concentración del calcio intracelular y en la producción de fosfatos de inositol al ser estimuladas por la NA; aunque con ligeras diferencias en la temporalidad durante la liberación de Ca^{2+}_i como respuesta. La actividad constitutiva característica de este receptor (García-Sáinz y Torres-Padilla, 1999; Gisbert et al, 2000; Noguera et al, 1996;) fue evidente al monitorear la concentración de calcio intracelular, cuando las células que expresan a los receptores truncados fueron

expuestas al BMY7378 y al TPA, en ambos casos se apreció una disminución en el nivel basal de Ca^{2+}_i , el primero actuando como agonista inverso y el segundo bloqueando la respuesta adrenérgica,

Los tres subtipos de RA- α_1 son fosfoproteínas que se encuentran fosforilados en su estado basal, la cual aumenta en presencia de NA y ésteres de forbol (García-Sáinz et al, 2001, 2004; Leeb-Lundberg et al, 1985; Vázquez-Prado et al, 2000). En este trabajo hemos detectado la fosforilación en ambos receptores truncados, a pesar de las dificultades en lograr inmunoprecipitar al RA- α_{1D} $\Delta N\Delta C$, cuya fosforilación es similar a la del RA- α_{1D} ΔN pero con una respuesta de menor magnitud.

La fosforilación de los RA- α_1 se asocia a su desensibilización tanto homóloga (García-Sáinz et al, 1999, 2001, 2004; Leeb-Lundberg et al, 1985, 1987; Vázquez-Prado et al, 1996, 1997, 2000), como heteróloga (Casas-González, et al, 2000; García-Sáinz et al, 2004; González-Arenas et al, 2006; Medina et al, 2000; Molina-Muñoz, 2008; Romero-Ávila et al, 2004; Rodríguez-Pérez et al, 2009). Y en nuestros resultados claramente se observó un bloqueo de la respuesta adrenérgica promovida por la activación de la PKC. La fosforilación en presencia de inhibidores de esta cinasa claramente abaten el efecto del TPA a diferencia del estímulo por la NA, pero al medir el calcio intracelular se obtuvieron resultados poco explicables (datos no mostrados).

Aún se tiene poca evidencia sobre la isoforma de la PKC involucrada en el bloqueo de las acciones adrenérgicas; por experimentos de coimmunoprecipitación del RA- α_{1B} e isoformas de la PKC, se vieron involucradas las isoformas α , δ y ϵ (Alcántara et al, 2001), y al parecer estas mismas participan en la regulación del RA α_{1D} (datos preliminares del laboratorio).

Los RA- α_1 presentan sitios probables de fosforilación en diferentes regiones del receptor, en especial en el carboxilo terminal y en la tercera asa intracelular. En trabajos anteriores con el RA- α_{1B} se mostró que el carboxilo terminal es indispensable para mediar la fosforilación y desensibilización, además los sitios implicados se localizan en esta región y corresponden a sitios blanco para las cinasas GRK (2 y 3) y PKC (Lattion et al, 1994; Diviani et al, 1997). En contraste, la desensibilización y la fosforilación del RA α_{1A} es independiente del carboxilo terminal (Price et al, 2002), lo cual se observó al intercambiar las colas carboxilo terminal de los RA α_{1A} y α_{1B} en receptores quiméricos (Vázquez-Prado

et al, 2000), al parecer depende de la tercera asa intracelular (trabajo del laboratorio en preparación). Aunque en un análisis del fosfoproteoma en una línea celular de tejido no maligno de hígado humano identifican dos fosfositios, uno efectivamente localizado en la tercera asa intracelular (Thr 273) y el otro curiosamente en la tercera asa extracelular (Ser304) (Sui et al, 2008).

En este trabajo se muestra que en el RA- α_{1D} esta región no es indispensable para su señalización. Existen trabajos previos del laboratorio que indican una sensibilidad diferencial al TPA entre los tres subtipos de receptores α_1 adrenérgicos, siendo el más susceptible el RA- α_{1D} siguiéndole el RA- α_{1B} y el RA- α_{1A} (Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996; Vázquez-Prado et al, 1997, 2000; García-Sáinz et al, 2001, 2004). Las regiones carboxilo terminal de los RA- α_1 difieren en secuencia, además de no encontrarse conservados los sitios de fosforilación del receptor α_{1B} , lo que podría explicar el particular modo de regulación de cada uno de ellos.

Los estudios futuros irán enfocados a caracterizar la fosforilación sitio específica, es decir a localizar los sitios donde ocurre la fosforilación; aunque existe la posibilidad que varios de ellos tengan una función redundante, existen sitios potenciales para PKC localizados tanto en el carboxilo como en la tercera asa intracelular (lugar donde también existe un número importante de sitios consenso para PKC) (Ver Anexo III y IV). Además, existe el reporte que la desensibilización del RA- α_{2A} se encuentra localizada principalmente en esta región (Liang et al, 2002). También existe la posibilidad de que la desensibilización no dependa fundamentalmente de la fosforilación (Pao y Benovic, 2002).

En un trabajo realizado en el laboratorio (Rodríguez-Pérez et al, 2009) en paralelo a este, se muestra que la activación de los RTKs inducen una desensibilización del RA- α_{1D} asociada a la fosforilación del receptor, dependiente de las cinasas PI3K y PKC. Con este antecedente decidimos comparar los efectos en la desensibilización de los RTKs (EGF, PDGF, IGF-I e insulina) sobre el receptor $\Delta N\Delta C$. Los resultados fueron similares al receptor ΔN , en cuanto al bloqueo de la respuesta adrenérgica, aunque no hemos realizado aún experimentos con inhibidores o de fosforilación en esta construcción.

Por otro lado, tratamos de ver los efectos sobre la respuesta adrenérgica al activar algunos miembros de los GPCRs que se acoplan a diferentes proteínas G. La estimulación

de los receptores para LPA, SP1, BK y ET causó en todos los casos una disminución en la respuesta a NA. La interpretación en este caso es más complicada debido a que ellos también se acoplan a la vía de fosfoinosítidos/calcio, y la disminución en el nivel de calcio intracelular puede deberse a la depleción en las pozas celulares; también el RA α_{1D} de rata (García-Sáinz, 2001) y de humano (datos preliminares del laboratorio) son susceptibles de fosforilación por estos agentes.

En realidad aún falta mucho por explicar al respecto de la comunicación cruzada entre estos receptores. En el laboratorio se tiene el antecedente de los trabajos con el RA- α_{1B} que indican que es desensibilizado por estos agentes, aunque con variaciones en la regulación.

Lo sorprendente e interesante es que este receptor α_{1D} sin tener ni el amino terminal ni el carboxilo terminal ($\Delta N\Delta C$) es totalmente funcional, presenta un comportamiento muy similar al receptor ΔN y puede intercomunicarse con otro grupo de receptores coexistentes en este contexto celular. Todo ello hace suponer que las asas intracelulares juegan un papel crucial en la desensibilización del RA- α_{1D} . Cabe mencionar que a pesar de que se han hecho múltiples estudios en los GPCRs donde se estudian determinantes estructurales no se había reportado alguno en que se eliminan ambos extremos terminales.

Otros estudios muestran que las sintrofinas se asocian a dominios PDZ en la región carboxilo terminal del receptor RA- α_{1D} , al sustituir esta región de interacción por alaninas disminuye el nivel de expresión proteica, así como la señalización de este receptor (Chen, 2006). Este dato se podría interpretar como contrario a nuestros resultados, en los que detectamos un nivel relativamente alto de expresión y totalmente funcionales. Esto se podría explicar de diferentes maneras, desde el contexto celular (células Rat-1 contra HEK293) hasta el tipo de sustitución o variación en el nivel de expresión; pero al parecer una mejor explicación sería la propuesta por Chen y colaboradores (2006), en la que otra secuencia presente en el carboxilo terminal, llamada PEST que actúa como una señal proteolítica, estaría descubierta y sensible a la degradación que ellos observan. Esta hipótesis no contradice nuestros resultados ya que nosotros eliminamos ambas regiones (Anexo IV). Por otro lado, las proteínas distrofinas (sintrofinas, distrobrevina y utrofina) forman complejos con el RA- α_{1D} , y el *knock-out* de algunas isoformas de las sintrofinas resulta en la pérdida de función del RA- α_{1D} en células de músculo liso de aorta, con una

reversión en el incremento de presión sanguínea mediada por este receptor (Lissand et al, 2008).

Estos hallazgos abren la posibilidad de una regulación modular, es decir que existan secuencias en las diferentes regiones del receptor que interaccionan con dominios proteicos de la maquinaria celular y que bajo, ciertas condiciones estén expuestas y activas, y bajo otras estén encubiertas o enmascaradas por otros dominios y por lo tanto inactivas. El panorama se complica aún más por la maquinaria molecular de un tipo celular específico, en el cual la asociación del receptor con proteínas de andamiaje promuevan la interacción con otras proteínas, formando complejos de señalización especializados (o *signalosomas*) en respuesta a estímulos específicos, y que en un determinado contexto celular se favorezca cierta conformación del receptor, donde regiones de la estructura del mismo estén regulando de manera diferencial su actividad a distintos niveles.

El receptor α_{1D} tiene una importante participación en la fisiología y patogenésis de la hipertensión, como se ha venido descubriendo en diversos estudios; por ejemplo 1) se sabe que un incremento en este receptor o un acoplamiento entre el receptor y la maquinaria contráctil del tejido vascular media la contracción en arterias tales como la aorta, carótida y mesentérica de ratas hipertensas (Gisbert, 2002; Villalobos-Molina e Ibarra, 1996, Villalobos-Molina et al, 1999); y 2) al eliminar el gen del RA- α_{1D} en ratones *knock out* se observa una resistencia a la hipertensión inducida por sal y un fenotipo hipotenso (Sanbe, 2009; Tanue 2002a, 2002b, 2002c).

En conclusión, la principal aportación de esta tesis es que el RA- α_{1D} sin amino y sin carboxilo terminales es funcional; expresa una densidad de receptores alta; tiene actividad constitutiva; es activado por el agonista; su acción puede ser bloqueada por la activación de otros receptores (RTKs y GPCRs) a través de la PKC principalmente, y la desensibilización está asociada en parte a la fosforilación. Además, nuestro trabajo contribuye, utilizando un enfoque estructural, a la comprensión del proceso de regulación de este receptor en la fisiología celular; y a que las futuras aplicaciones clínicas, tomen en cuenta que el desarrollo de fármacos esté dirigido a otras regiones del receptor, por ejemplo hacia las asas intracelulares.

XI.-CONCLUSIÓN

El receptor adrenérgico- α_{1D} humano carente del amino y carboxilo terminales:

- 1) Expresa un número mayor de receptores membranales que el receptor nativo;
- 2) Es funcionalmente activo;
- 3) Presenta actividad intrínseca;
- 4) Es fosforilado por la NA y por el TPA, aunque en menor grado;
- 5) Es desensibilizado por el agonista y por otras familias de receptores no adrenérgicos pero que principalmente llevan a una activación de la PKC.

XII.-BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter P. (2002) "Molecular Biology of THE CELL" 4ª Ed. Garland Science
- Alcántara-Hernández, R., Leyva-Illades, D. y García-Sáinz, J.A. (2001) "Protein kinase C- α 1b-adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate" *Eur. J. of Pharmacol.* 419:9-13pp.
- Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Casanova, E., Ovalle, S., Calvo, P. y Chinchetru, M.A. (1995) "Molecular Cloning of α 1b-Adrenergic Receptor and Tissue Distribution of Three α 1-Adrenergic Receptor Subtypes in Mouse" *J. Neurochem.* 65:2387-2392pp.
- Alquist, R.P. (1948) "A study of the adrenotropic receptor" *Am. J. Physiol.* 153: 586-589pp.
- Audet, M. y Bouvier, M. (2008) "Insights into signaling from the β 2-adrenergic receptor structure" *Nature Chem. Biol.* 4 (7):397-403pp.
- Bautista, D.L., Morris, D.H., Stein, L., Asher, W. y Hammitt, T.(2006) "A Two Model Receptor System of the Alpha1D Adrenergic Receptor To Describe Interactions with Epinephrine and BMY7378" *J. Chem. Inf. Model.* 46:334-344pp.
- Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, C.P., Heslop, J.P. e Irvine, R.F. (1983) "Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides" *Biochem. J.* 212: 473-482pp.
- Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1989) "Inositol phosphates and cell signalling" *Nature.* 341: 197-205pp.
- Bockaert, J. y Pin, J. (1999) "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success" *The EMBO J.* 18(7)1723-1729pp.
- Bouvier, M L., Leeb-Lundberg, M.F., Benovic, J.L., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) "Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation: II Effects of agonist occupancy on phosphorylation of α 1 and β 2 adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP dependent protein kinase". *JBC.*262 (7): 3106-3113 pp.
- Boyle, W.J., Van Der Geer, P. y Huter, T. (1991) "Phosphopeptide Mapping and Phosphoamino Acid Analysis by Two-Dimensional Separation on Thin-Layer Cellulose Plates" *Methods in Enzymol.* 201: 110-149pp.
- Bruno, J.F., Whittaker, J., Song, J. y Berelowitz, M. (1991) "Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding a human α 1A adrenergic receptor" *BBRC.* 179: 1485-1490pp.
- Canals, M. López-Gimenez, J.F. y Milligan, G. (2009) "Cell surface delivery and structural re-organization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective α 1b-adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers" *Biochem. J.* 417, 161–172pp.
- Casas-González, P., Vázquez-Prado, J. y García-Sáinz, J.A. (2000) "Lysophosphatidic Acid Modulates α 1b-Adrenoceptor Phosphorylation and Function: Roles of Gi and Phosphoinositide 3-Kinase" *Mol. Pharmacol.*57:1027-1033pp.
- Claing, A. (2004) " Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis by ARF6 GTP-binding proteins" *Biochem. Cell Biol.* 82: 610-617pp.

- Cohn, H.I., Harris, D.H., Pesant, S., Pfeiffer, M., Zhou, R., Koch, W.J., Dorn G.W. y Eckhart, A.D. (2008) "Inhibition of Vascular Smooth Muscle G Protein-coupled Receptor Kinase 2 Enhances α_1 D-Adrenergic Receptor Constriction" *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.295: H1695-H1704pp.
- Corvera, S. y García-Sáinz, J.A. (1984) "Phorbol esters inhibit alpha 1 adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 1128-1133pp.
- Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M. y García-Sáinz, J.A. (1986) "Phorbol esters inhibit alpha 1 adrenergic effects and decrease the affinity of liver cell alpha 1-adrenergic receptors for (-)-epinephrine" *JBC*. 261: 520-526pp.
- Cotecchia, S., Exum, S., Caron, M.G., y Lefkowitz, R.J. (1990) "Regions of the α_1 -adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function" *PNAS*. 87:2896-2900pp.
- Chalothorn, D., McCune, D.F., Edelman, S.E., García-Cazarín, M.L., Tsujimoto, G. y Piascik, M.T. (2002) "Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the α_1 -adrenoreceptor subtypes" *Mol. Pharmacol.* 61: 1008-1016pp.
- Chen, Z., Hague, C., Hall, R.A. y Minemann, K.P. (2006) "Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction". *JBC*. 281: 12414-12420pp.
- Chen, S.H., Xu, M., Lin, F., Lee, D., Riek, P. y Graham, R.M. (1999) "Phe³¹⁰ in transmembrane VI of the α_{1B} -adrenergic receptor is a key switch residue involved in activation and catecholamine ring aromatic bonding" *JBC*. 274: 16320-16330pp.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. y Cohen, P. (2000) "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors" *Biochem. J.* 351: 95-105pp.
- Diviani, D., Lattion, A.L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic J.L.,Cotecchia, S. (1996) "Effect of different G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *JBC*.271:5049–5058pp.
- Diviani, D., Lattion, A.L. y Cotecchia, S. (1997) "Characterization of the Phosphorylation Sites Involved in G Protein-coupled Receptor Kinase- and Protein Kinase C-mediated Desensitization of the α_{1B} -Adrenergic Receptor" *JBC* 272: (45): 28712–28719pp.
- Diviani, D., Lattion, A.L., Abuin, L., Staub, O. y Cotecchia, S.(2003) "The adaptador complex 2 directly interacts with the α_{1B} -adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis". *JBC*. 278: 19331-19340pp.
- Dixon, R.A.F (1994) "Structure and Function of G Protein-Coupled Receptors" 63: 101-132pp.
- Downward, J. (2001) "The ins and outs of signaling" *Nature*. 411:759-762 pp.
- Esbenshade, T.A., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Tanaka, T., Yano, J., Minnemann, K.P. y Murphy, T.J.(1995) "Cloning of the Human 1d-Adrenergic Receptor and Inducible Expression of Three Human Subtypes in SK-N-MC Cells" *Mol. Pharmacol.* 47: 977-985pp.
- Ferguson, S.S. (2001) "Evolving concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling" *Pharmacol. Rev.* 53: 1-24pp.
- Fonseca, M.I., Button, D.C. y Brown, R.D., (1995) "Agonista regulation of α_{1B} -adrenergic receptor subcellular distribution and function" *JBC*. 270: 8902-8909pp.

Ford, C.E., Skiba, N.P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L.R., Rosal, R., Weng, G., Yang, Ch-Sh, Inyengar, R., Miller, R.J., Jan, L.Y., Lefkowitz, R.J. y Hamm, H.E. (1998) "Molecular Basis for Interactions of G Protein β Subunits with Effectors". *Science*. 280: 1271-1274pp.

Ford, S.M., Bonner, T.I., Neubig, R.R., Rosser, E.M., Pin, J.P., Davenport, A.P., Spedding, M. y Harmar, A.J. (2005) "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list" *Pharmacol. Rev.* 57(2):279-88pp.

Forray, C., Bard, J.A., Wetzel, J.M., Chiu, G., Shapiro, E., Tang, R., Lepor, H., Harting, P.R., Weinschenk, R.L., Branchek, T.A. y Gluchowski, Ch. (1994) "The α_1 -Adrenergic Receptor that Mediates Smooth Muscle Contraction Human Prostate has the Pharmacological Properties of the Cloned Human α_{1C} Subtypes" *Mol. Pharmacol.* 45: 703-708pp.

Fredriksson, R., Lagerström, M.C. Lundin, L.G. y Schiöth, H.B. (2003) "The G-Protein Coupled Receptors in the Genome Form Five Main Families, Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups and Fingerprints" *Mol. Pharmacol.* 63: 1256-1272pp.

Fredriksson, R. y Schiöth, H.B. (2005) "The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes" *Mol. Pharmacol.* 67: 1414-1425pp.

García-Cazarín, M.L., Smith, J.L., Olszewski, K.A., McCune, D.F., Simmerman, L.A., Hadley, R., Kraner, S.D. y Piascik, M.T. (2008) "The α_{1D} -adrenergic receptor is expressed intracellularly and coupled to increases in intracellular calcium and reactive oxygen species in human aortic smooth muscle cells" *J. of Mol. Signal.* 3(6):1-9pp.

García-Sáinz, J.A., Romero-Ávila, M.T., Villalobos-Molina, R. y Minneman, K.P. (1995) " α_1 -Adrenoceptor subtype selectivity of tamsulosin: studies using fibres from different species" *Eur. J. of Pharmacol.* 289: 1-7pp.

García-Sáinz, J.A. (1996) Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular. Fondo de Cultura Económico, Colección la Ciencia desde México. 120 pág.

García-Sáinz, J.A., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado, J. y Romero-Ávila, M.T. (1999a) "Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human α_{1b} -adrenoceptors" *Eur. J. of Pharmacol.* 385: 263-271pp.

García-Sáinz, J.A. y Torres-Padilla, M.E. (1999b) "Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1d} -adrenoceptors" *FEBS Letters* 443: 277-281pp.

García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J. y Villalobos-Molina, R. (1999c) " α_1 -Adrenoceptors: Subtypes, Signaling, and Roles in Health and Disease" *Arch. of Medical Res.* 30: 449-458pp.

García-Sáinz, J.A., Vázquez-Cuevas, F.J. y Romero-Ávila, M.T. (2001) "Phosphorylation and desensitization of α_{1d} -adrenergic receptors" *Biochem. J.* 353:603-610pp.

García-Sáinz, J.A., Romero-Ávila, M.T., Molina-Muñoz, T. y Medina L.C. (2004a) "Insulin induces α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation and desensitization" *Life Sci* 75: 1937-1947pp.

García-Sáinz, J.A., Rodríguez-Pérez, C.E. y Romero-Ávila, M.T. (2004b) "Human α_{1D} -adrenoceptor phosphorylation and desensitization" *Biochem. Pharmacol.* 67: 1853-1858pp.

García-Sáinz, J.A. y Villalobos-Molina, R. (2004) "The elusive α_{1D} -adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles" *Eur. J. of Pharmacol.*

George, S.R., O'Dowd, B.F. y Lee, S.P. (2002) "G-Protein-Coupled Receptor Oligomerization and its potential for drug discovery" *Nature*. 1: 808-820pp.

- Gilman, A.G. (1987) "G Proteins Transducers of Receptors generated signals" *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649pp.
- Gisbert, R., Noguera, M. D. Ivorra, M.A. y D'Ocon, P. (2000) "Functional Evidence of a Constitutively Active Population of α_{1D} -Adrenoceptors in Rat Aorta" *The J. of Pharmacol. And Expr. Ther.* 295(2):810-817pp.
- Gisbert, R., Pérez-Vizcaino, F. Cogolludo, A.L., Noguera, M. A., Ivorra, M. D., Tamargo, J. y D' Ocon, P. (2003) "Cytosolic Ca^{2+} and Phosphoinositide Hydrolysis Linked to Constitutively Active α_{1D} -Adrenoceptors in Vascular Smooth Muscle" *The J. of Pharmacol. and Exp. Therapeutics.*305: 1006-1014pp.
- Gisbert, R., Ziani,K., Miquel,R., Noguera,M.A., Ivorra, M.D., Anselmi E. y D'Ocon, P.(2002) "Pathological role of a constitutively active population of α_{1D} -adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats" *British J. of Pharmacology* 135, 206- 216pp.
- Goetz, A.S., King, H.K, Ward, S.D.C., True, T.A., Rimele, T.J. y Saussy, D.L. (1995) "BMY7378 is a selective antagonist of the D subtype of α_1 -adrenoceptors" *Eur. J. Pharmacol.* 272: R5-R6pp.
- González-Arenas, A., Aguilar-Maldonado, B., Avendaño-Vázquez, S.E. y García-Sáinz, J.A. (2006) "Estrogens cross-talk to alpha 1b-adrenergic receptors" *Mol Pharmacol.* 70(1): 154-162pp.
- González-Cabrera, P.J., Shi, T., Yun, J., McCune, D., Rorabaugh, B. y Perez, D.M. (2004) "Differential Regulation of the Cell Cycle by α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes" *Endocrinol.* 145(11):5157-5167pp.
- Greasley, P.J., Fanelli, F., Scheer, A., Abuin, L., Nenniger-Tosato, M., De Benedetti, P.G., (2001) "Mutational and computational analysis of the alpha1b-adrenergic receptor: involvement of basic and hydrophobic residues in receptor activation and G protein coupling. *JBC.*276:46485–46494pp.
- Grynkiewicz G., Poenie G. y Tsien R.Y. (1985) "A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties" *JBC.* 260: 3440-3450pp.
- Hague, C., Chen, Z., Pupo, A.S., Schulte, N., Toews, M.L. y Minemann, K.P. (2004a) "The N-terminus of the human α_{1D} -adrenergic receptor prevents cell surface expression" *J. Pharm. Exp.Ther.* 309: 388-397pp.
- Hague, C., Uberti, M., Chen, Z., Hall, R.A. y Minneman, K.P. (2004b) "Cell surface expression of α_{1D} -ARs is controlled by heterodimerization with α_{1B} -adrenergic receptors. *JBC.*279:15541-15549pp.
- Hague, Ch., Lee, S.E., Chen, Z., Prinster, S.C., Hall, R.A. y Minneman, K.P. (2006) "Heterodimers of α_{1B} - and α_{1D} -Adrenergic Receptors Form Single Functional Entity" *Mol Pharmacol* 69:45–55pp.
- Hamm, H.E. (1998) "The Many Faces of G Protein Signaling" *JBC.* 273 (2):669-672pp.
- Han,C.H., Abel, P.W. y Minneman, K.P.(1987) "Heterogeneity of α_1 -Adrenergic Receptors Revealed by Chlorenthylclonidine" *Mol. Pharmacol.* 32:505-510pp.
- Harado, K, Ohmori, M. y Fujimura, A. (1996) "Comparison of the antagonistic activity of tamsulosin and doxazosin at vascular α_1 -adrenoceptor in humans" *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 354:557-561pp.
- Hawrylyshyn, K.A., Michelotti, G.A., Cogé, F., Guénin, S.P. y Schwinn, D.A. (2004) "Update on human α_1 -adrenoceptor subtype signaling and genomic organization" *TRENDS in Pharmacological Sci.* 25 (9): 449-455pp.
- Helper, J.R. y Gilman, A.G. (1992) "G proteins" *TIBS.* 17:383-387pp.

- Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P. y Ruffolo Jr., R.R. (1995) "International Union of Pharmacology. X. Recommendation for Nomenclature of α_1 -Adrenoceptors consensus update". *Pharmacol. Rev.* 47 (2):267-270pp.
- Horie, K., Obika, K., Foglar, R. y Tsujimoto, G (1995) "Selectivity of imidazoline α -adrenoceptor agonists (oxymetazoline and cirazoline) for human cloned α -adrenoceptor subtypes". *Br. J. of Pharmacol.* 116: 1611-1618pp.
- Hosoda, Ch., Koshimizu, T., Tanoue, A., Nasa, Y., Oikawa, R., Tomabeche, T., Fukuda, Sh., Shinoura, H., Oshikawa, S., Takeo, S., Kitamura, T., Cotecchia, S. y Tsujimoto, G. (2005) "Two α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes Regulating the Vasopressor Response Have Differential Roles in Blood Pressure Regulation" *Mol. Pharmacol.* 67(3):912-922pp.
- Hubbard, S.R. y Miller, W.T. (2007) "Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling" *Current Opinion in Cell Biology*, 19:117-123pp.
- Hupfeld, C.J. y Olefsky, J. M. (2007) "Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins" *Annu. Rev. Physiol.* 69:561-577pp.
- Huerta-Bahena, J., Villalobos-Molina, R. y García-Sáinz, J.A. (1982) "Cyclohexamide: an adrenergic agent" *Life Science*. 30: 1757-1762pp.
- Hwa, J., Graham, R.M., y Perez, D.M. (1995) "Identification of Critical Determinants of α_1 -Adrenergic Receptor Subtype Selective Agonist Binding" *JBC.* 270(39):23189-23195pp.
- Hwa, J., Graham, R.M. y Perez, D.M. (1996) "Chimeras of α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes Identify Critical Residues That Modulate Active State Isomerization" *JBC.* 271 (14): 7956-7964pp.
- Ishiguro, M., Futabayashi, Y., Ohnuki, T., Ahmed, M., Muramatsu, I. y Nagatomo, T. (2002) "Identification of binding sites of prazosin, tamsulosin and KMD-3213 with α_1 -adrenergic receptor subtypes by molecular modeling. *Life Sci.* 71:2531-2541pp.
- Iwata, Y., Shigekawa, M. y Wakabayashi, Sh. (2005) "Cardiac syntrophin isoforms: Species-dependent expression, association with dystrophin complex and subcellular localization" *Molecular and Cellular Biochemistry* 268: 59-66pp.
- Khattar, S.K., Bora, R.S., Priyadarsiny, P., Gautam, A., Gupta, D., Tiwari, A., Nanda, K., Singh, R., Chugh, A., Bansal, V., Mookhtiar, K. y Saini, K.S. (2006) "Molecular cloning, stable expression and cellular localization of human α_1 -adrenergic receptor subtypes: effect of charcoal/dextran treated serum on expression and localization of α_1 -adrenergic receptor" *Biotechnol. Lett.* 28:1731-1739pp.
- Kobilka, B. (1992) "Adrenergic Receptors as models for G protein-coupled receptors" *Annu. Rev. Neurosci.* 15: 87-114pp.
- Kolakowski, L.F. Jr. (1994) "GCRDb: a G-protein-coupled receptor database" *Receptor Channels*. 2(1):1-7pp.
- Koshimizu, T.A., Tanoue, A. y Tsujimoto, G. (2007) "Clinical implications from studies of alpha adrenergic receptor knockout mice" *Biochem. Pharmacol.* 73: 1107-1112pp.
- Krupnick, J.G. y Benovic, J.L. (1998) "The role of receptor kinase arrestins in G protein-coupled receptor regulation" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 289-319pp.
- Lattion, A.L., Diviani, D. y Cotecchia, S. (1994) "Truncation of the receptor impairs agonist-induced phosphorylation and desensitization of the α_1 B-adrenergic receptor". *JBC.* 269:22887-22893pp.

- Lauffer, B.E., Chen, S., Melero, C., Kortemme, T., von Zastrow, M. y Vargas, G.A. (2009) "Engineered Protein Connectivity to Actin Mimics PDZ-dependent Recycling of G Protein-coupled Receptors but Not Its Regulation by Hrs" *JBC*. 284 (4):2448–2458pp.
- Leeb-Lundberg, L.M.F, Cotecchia, S., Lomasney, J. W., DeBernardis, J.F., Lefkowitz, R.J. y Caron, M. G. (1985) "Phorbol esters promote α_1 -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism" *PNAS*. 82: 5651-5655pp.
- Leeb-Lundberg, L.M.F, Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) "Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation: I. Agonist-promoted desensitization of α_1 -adrenoceptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells". *JBC*.262: 3098-3105pp.
- Lefkowitz, R.J (1998) "G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and β -arrestin in receptor signalling and desensitization" *JBC*. 273: 18,677-18, 680pp.
- Liang, M., Eason, M.G., Theiss, C.T., Liggett, S.B. (2002) "Phosphorylation of Ser³⁶⁰ in the third intracellular loop of the α_{2A} -adrenoceptor during protein kinase C-mediated desensitization" *Eur. J. of Pharmacol*. 437: 41-46pp.
- Liu, W.S. y Heckman, C.A. (1998) "The sevenfold way of PKC regulation" *Cell Signal*. 10(8): 529-542pp.
- Lomasney, J.W., Cotecchia, S, Lorenz, W, Leung, W-Y, Schwinn, D.A., Yang-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1991) "Molecular Cloning and Expression of the cDNA for the α_{1A} -Adrenergic Receptor" *JBC*. 266(10): 6365-6369pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with Folin phenol reagent" *JBC*. 193: 265-275pp.
- Luttrell, L.M., Ostrowski, J., Cotecchia, S., Kendall,H. y Lefkowitz, R.J. (1993) "Antagonism of Catecholamine Receptor Signaling by Expression of Cytoplasmic Domains of the Receptors". *Science*. 259: 1453-1457pp.
- Lyssand, J.S., DeFino, M.C., Tang, X., Hertz, A.L., Feller, D.B., Wacker, J.L., Adams, M.E. y Hague, Ch. (2008) "Blood pressure is regulated by an $\alpha 1D$ -adrenergic receptor/ dystrophin signalosome" 283 (27):18792-18800pp.
- Madziva, M.T. y Birnbaumer, M. (2006) "A Role for ADP-ribosylation Factor 6 in the Processing of G-protein-coupled Receptors" *JBC*. 281(17): 12178-12186pp.
- Marinissen, M.J. y Gutkind, J.S.(2001) "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms" *TRENDS in Pharmacol.Sci*.22(7): 368-376pp.
- McCune,D.F., Edelman, S., Olges, J.R., Post,G.R., Waldrop, B.A., Waugh, D.J.J., Perez, D.M. y Piascik, M.T.(2000) "Regulation of the Cellular Localization and Signaling Properties of the $\alpha 1B$ - and $\alpha 1D$ -Adrenoceptors by Agonists and Inverse Agonists" *Mol. Pharmacol*.57:659–666 pp.
- Medina, L.C., Vazquez-Prado J.,Torres-Padilla, M.E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz-Muñoz, M.E. y García-Sáinz, J.A.(1998) "Crosstalk: phosphorylation of $\alpha 1b$ -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors" *FEBS Letters* 422:141-145pp.
- Medina, L.C., Vazquez-Prado J. y García-Sáinz, J.A. (2000) "Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and α_{1b} -adrenoceptors" *Biochem. J*. 350, 413-419pp.
- Melvin, I.S., Strathmann, M.P. y Gautam, N.(1991) "Diversity of G proteins in Signal Transduction" *Science*. 252: 802-808pp.

- Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. y Bouvier, M. (2002) "Quantitative assesment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer" *JBC*. 277 (44): 925-931pp.
- Milligan, G. (2009) "G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function" *British J. of Pharmacol.* 1-10pp.
- Michel, M. C., Kenny, B. y Schwinn, D.A. (1995) "Classification of α_1 -adrenoceptors subtypes" *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 352: 1-10pp.
- Molina-Muñoz, T. Romero-Ávila, M.T., Avendaño-Vázquez, S.E. y García-Sáinz, J.A. (2008) "Phosphorylation, desensitization and internalization of human alpha1B-adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I". *Eur. J. Pharmacol.* 578(1):1-10pp.
- Morris, D.P., Lei, B., Wu, Y., Michelotti, G.A. y Schwinn, D.A. (2008) "The α_{1A} -Adrenergic Receptor Occupies Membrane Rafts with Its G Protein Effectors but Internalizes via Clathrin-coated Pits" 283(5): 2973–2985pp.
- Morrow, A.L. y Creese, I. (1986) "Characterization of α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: A reevaluation of [3H] prazosin binding" *Mol. Pharmacol.* 29:321-pp.
- Nagaoka, Y., Ahmed, M., Hossain, M., Bhuiyan, M.A., Ishiguro, M., Nakamura, T., Watanabe, M. y Nagatomo, T. (2008) "Amino Acids of the Human α_{1D} -Adrenergic Receptor Involved in Antagonist Binding" *J. Pharmacol. Sci.* 106:114–120pp.
- Neer, E.J. (1995) "Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals" *Cell.* 80: 249-257pp.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2005) "Lehninger Principles of Biochemistry" 4ª Ed. Freeman, W. H. & Co.
- Newton, AC. (2003) "Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm" *Biochem. J.* 370(Pt 2):361-71pp.
- Norman, J. y Litwack, G. (1997) Hormones. 2ª Ed. Academic Press.
- Okumura, A., Akiko Okumura, Katsuya Nagai and Nobuaki Okumura (2008) "Interaction of α_1 -syntrophin with multiple isoforms of heterotrimeric G protein α subunits" *The FEBS J.* 275: 22-33pp.
- Pao, Ch.S. y Benovic, J.L. (2002) "Phosphorylation-Independent Desensibilization of G Protein-Coupled Receptors?"
- Perez, D.M. (2007) "Structure–function of α_1 -adrenergic receptors" *Biochem. Pharmacol.* 73 (8) :1051-1062pp.
- Petrovska (2005) "Addition of a signal peptide séquence to the α_{1D} -adrenoceptor gene increase the density of receptors, as determinated by [3 H]-prazosin binding in the membranes" *British J. of Pharmacol.* 1-9pp.
- Piasek, M.T., Guarino, R.D., Smith, M.S., Soltis, E.E., Saussy, D.L. and Perez, D.M. (1995) "The Specific Contribution of the Novel Alpha-1D Adrenoceptor to the Contraction of Vascular Smooth Muscle" *The J. Of Pharm. And Exp. Ther.* 275 (3): 1583-1589 pp.
- Pin, J.P., Kniazeff, J., Binet, V., Liu, J., Maurel, D., Galvez, T., Duthey, B., Havlickova, M., Blahos, J., Prézeau, L. y Rondard, P. (2004) "Activation mechanism of the heterodimeric GABA(B) receptor" *Biochem. Pharmacol.* 68(8):1565-72pp.

- Price, D.T., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Berkowitz, D.E., Meyers, W.C. y Schwinn, D.A. (1994) "Localization of mRNA for three distinct α_1 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: Implications for human alpha-adrenergic physiology. *Mol. Pharmacol.* 45: 171-175pp.
- Price, R.R., Morris, D.P., Biswas, G., Smith, M.P. y Schwinn, D.A. (2002) "Acute Agonist-mediated Desensitization of the Human α_1 -Adrenergic Receptor Is Primarily Independent of Carboxyl Terminus Regulation. IMPLICATIONS FOR REGULATION OF α_1 AR SPLICE VARIANTS *JBC.* 277: (11) 9570–9579pp.
- Pupo, A.S., Uberti, M.A. y Minneman, K.P. (2003) "N-terminal truncation of human α_{1D} -adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein" *Eur. J. of Pharmacol.* 462:1-8pp.
- Pyne, N.J., Waters, C.M., Long, J.S., Moughal, N.A., Tigyi, G. y Pyne, S. (2007) "Receptor tyrosine kinase-G-protein coupled receptor complex signaling in mammalian cells" *Advan. Enzymol. Regul.* 47:271–280pp.
- Robles-Flores, M., Meléndez, L., García, W., Mendoza-Hernández, G., Lam, T.Y. , Castañeda-Patlán, C. y González-Aguilar, H. (2008) "Posttranslational modifications on protein kinase c isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters" *Biochimica et Biophysica Acta* 1783: 695–712pp.
- Rodríguez-Pérez, C.E., Calva-Ochoa, E., Kalashnikova, E.V., Reyes-Cruz, G., Romero-Ávila, M.T. y García-Sáinz, J.A. (2009) "Receptor tyrosine kinase regulate α_{1D} -adrenoceptor signaling properties: Phosphorylation and desensitization" *The Internal. J. of Biochem. & Cell Biol.* 41:1276-1283pp.
- Romero-Ávila, M.T., Flores-Jasso, C.F. y García-Sáinz, J.A. (2002) " α_{1B} -Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor- β " *Biochem J.* 368; 581–587pp.
- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G. y Kobilka, B. (2009) "The structure and function of G-protein-coupled receptors" *NATURE.* 459:356-363pp.
- Rossier, O., Abuin, L., Fanelli, F., Leonardi, A. y Cotecchia, S. (1999) "Inverse Agonism and Neutral Antagonism at α_1a - and α_1b -Adrenergic Receptor Subtypes" *Mol. Pharmacol.* 56:858–866pp.
- Roskopf, D. y Michel, M.C. (2008) "Pharmacogenomics of G Protein-Coupled Receptor Ligands in Cardiovascular Medicine" *Pharmacol Rev* 60:513–535pp.
- Rovati, G.E., Capra, V. y Neubig, R.R. (2006) "The Highly Conserved DRY Motif of Class A GPCRs: Beyond the Ground State" *Mol.Pharmacol.*
- Sanbe, A, Tanaka, Y., Fujiwara, Y., Miyauchi, N., Mizutani, R., Yamauchi, J., Cotecchia, S., Koike, K., Tsujimoto, G. y Tanoue, A. (2009) "Enhanced vascular contractility in alpha1-adrenergic receptor-deficient mice" *Life Sci.* 84: 713-718pp.
- Schlessinger J. (2000) "Cell signaling by receptor tyrosine kinases". *Cell.* 103:211–225pp.
- Sui, S., Wang, J., Yang, B., Song, L., Zhang J., Chen, M., Liu, J., Lu, Z., Cai, Y., Chen, S., Bi, W., Zhu, Y., He, F. y Qian, X. (2008) "Phosphoproteome analysis of the human Chang liver cells using SCX and a complementary mass spectrometric strategy" *Proteomics*, 8: 2024-2034pp.
- Suzuki, F., Miyamoto, S., Takita, M, Oshita, M., Watanabe, Y., Kakizuka, A., Narumiya, S.H., Taniguchi, T. y Muramatsu, I. (1997) "Cloning, functional expression and tissue distribution of rabbit α_{1d} -adrenoceptor" *BBA.* 1323: 6-11pp.
- Stanasila, L., Perez, J.P, Vogel, H. y Cotecchia, S. (2003) "Oligomerization of the α_1a -and α_1b adrenergic receptor subtypes. Potencial implications in receptor internalization". *JBC.* 278: 40239-40251pp.

- Taguchi, K., Yang, M., Goepel, M. y Michel, M.C. (1998) "Comparison of human α_1 -adrenoreceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signaling pathways" *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357: 100-110pp.
- Tanoue, A., Koba, M., Miyawaki, S., Koshimizu, T.A., Hosoda, C., Oshikawa, S. y Tsujimoto, G. (2002a) "Role of the α_1D -adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension". *Hypertension.* 40(1): 101-106pp.
- Tanoue, A., Koshimizu, T. A. y Tsujimoto, G. (2002b) Transgenic studies of α_1 (1)-adrenergic receptor subtype function. *Life Sci.* 71, 2207-2215pp.
- Tanoue, A., Nasa, Y., Koshimizu, T., Shinoura, H., Oshikawa, S., Kawai, T., Sunada, S., Takeo, S. y Tsujimoto, G. (2002c) "The α_1D -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction". *J. Clin. Invest.* 109(6): 765-775pp.
- Terman, B.I., Grodski, R.A., Hess, H.J. y Graham, R.M. (1990) "Identification and Structural Characterization of α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes" *Mol.Pharmacol.* 37: 526-534pp.
- Trejo, J. (2005) "Internal PDZ ligands: Novel Endocytic Recycling Motifs for G Protein-Coupled Receptors" *J. Biol. Chem.* 280(5):1388-1390pp.
- Tobin, A.B., Butcher, A.J. y Kong, K.Ch. (2008) "Location, location, location. . . site specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling" *TIPS*-631;
- Toews, M.L., Prinster, S.C. y Schulte, N.A. (2003) "Regulation of α_1B adrenergic receptor localization, trafficking, function, and stability" *Life Sci.* 74:379-389pp.
- Uberti, M.A., Hall, R.A. y Minneman, K.P. (2003) "Subtype-specific dimerization of α_1 -adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties" *Mol. Pharmacol.* 64: 1379-1390pp.
- Uberti, M.A., Hague, Ch., Oller, H., Minneman, K.P. y Hall, R.A. (2005) "Heterodimerization with β_2 -Adrenergic Receptors Promotes Surface Expression and Functional Activity of α_1D -Adrenergic Receptors" *JPET* 313:16-23pp.
- Vázquez-Prado, J. y García-Sáinz, J.A. (1996) "Effect of Phorbol Myristate Acetate on α_1 -Adrenergic Action in Cells Expressing Recombinant α_1 -Adrenoceptor Subtypes" *Mol.Pharmacol.*, 50:17-22pp.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C. y García-Sáinz, J.A. (1997) "Activation of Endothelin ET_A Receptors Induces Phosphorylation of α_{1b} -Adrenoreceptors in Rat-1 Fibroblasts" *J. Biol. Chem.* 272(43):27330-27337pp.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero-Ávila, M.T., González-Espinoza, C., García-Sáinz, J.A. (2000) "Norepinephrine and phorbol ester-induced phosphorylation of α_1A -adrenergic receptors" *JBC.* 275:27330-27337pp.
- Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J. e Ibarra, M. (1999) "Functional evidence of α_1D -adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats" *British J. of Pharmacol.* 126:1534-1536pp.
- Vinci, M.C., Bellik, L., Filippi, S., Ledda, F. y Parenti, A. (2007) "Trophic effects induced by α_1D -adrenoceptors on endothelial cells are potentiated by hypoxia" *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293: H2140-H2147pp.
- Wier, W.G. y Morgan, K.J. (2003) " α_1 -Adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries" *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 150:91-139pp.

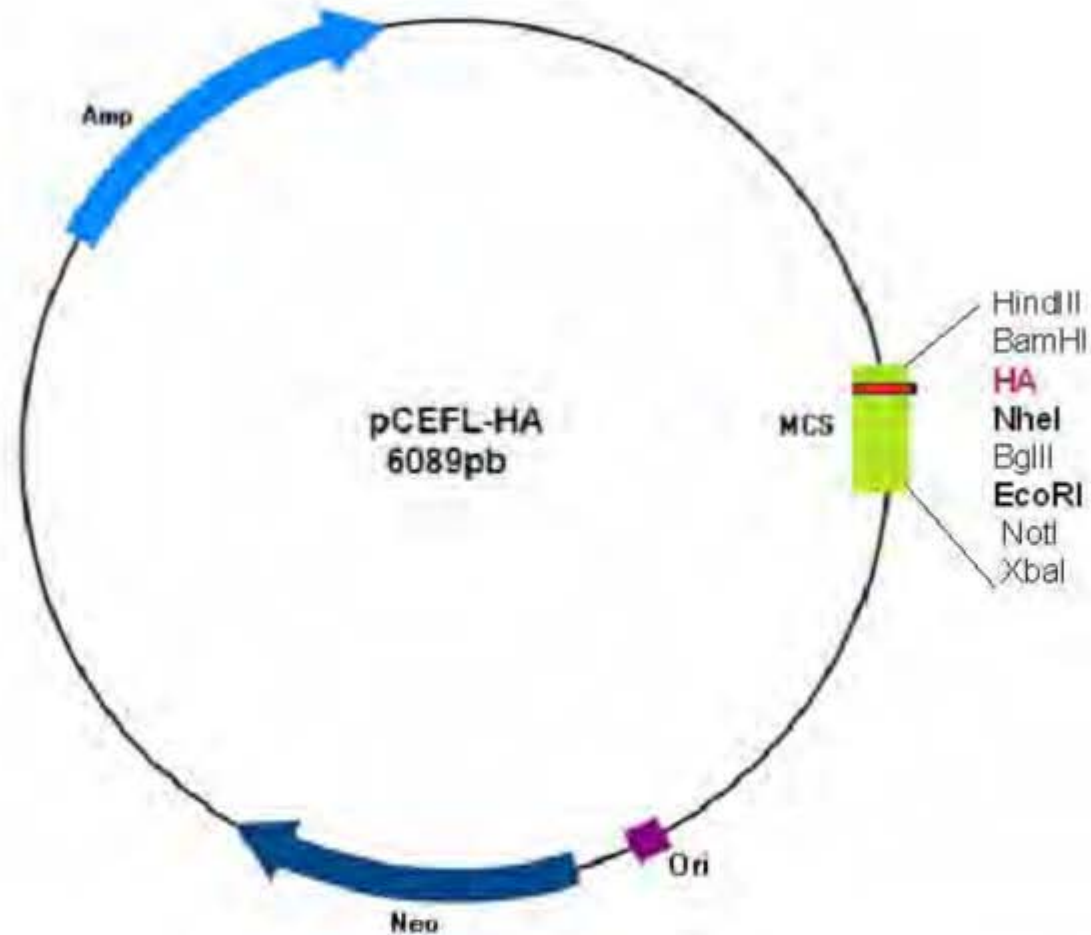
Whitworth, J.A. (2003) "World Health Organization (WHO) International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension" *J. Hypertension*. 21: 1983-1992pp.

Wu, D., Katz, A., Lee, Ch. y Simon, M.I. (1992) "Activation of Phospholipase C by α -Adrenergic Receptors Is Mediated by the α Subunits of Gq Family" *267(36):25728-25802pp*.

Yang-Feng, T.L., Han, H., Lomasney, J.W. y Caron, M.G. (1994) "Localization of the cDNA for an 1-adrenergic receptor subtype (ADRA1D) to chromosome band 20p13" *Cytogenet. Cell. Genet.* 66: 170-171pp.

Yin, D., Gavi, S., Wang, H. y Malbon, C.C. (2004) "Probing Receptor Structure/Function with Chimeric G-Protein-Coupled Receptors" *Mol Pharmacol* 65:1323-1332pp.

ANEXO I



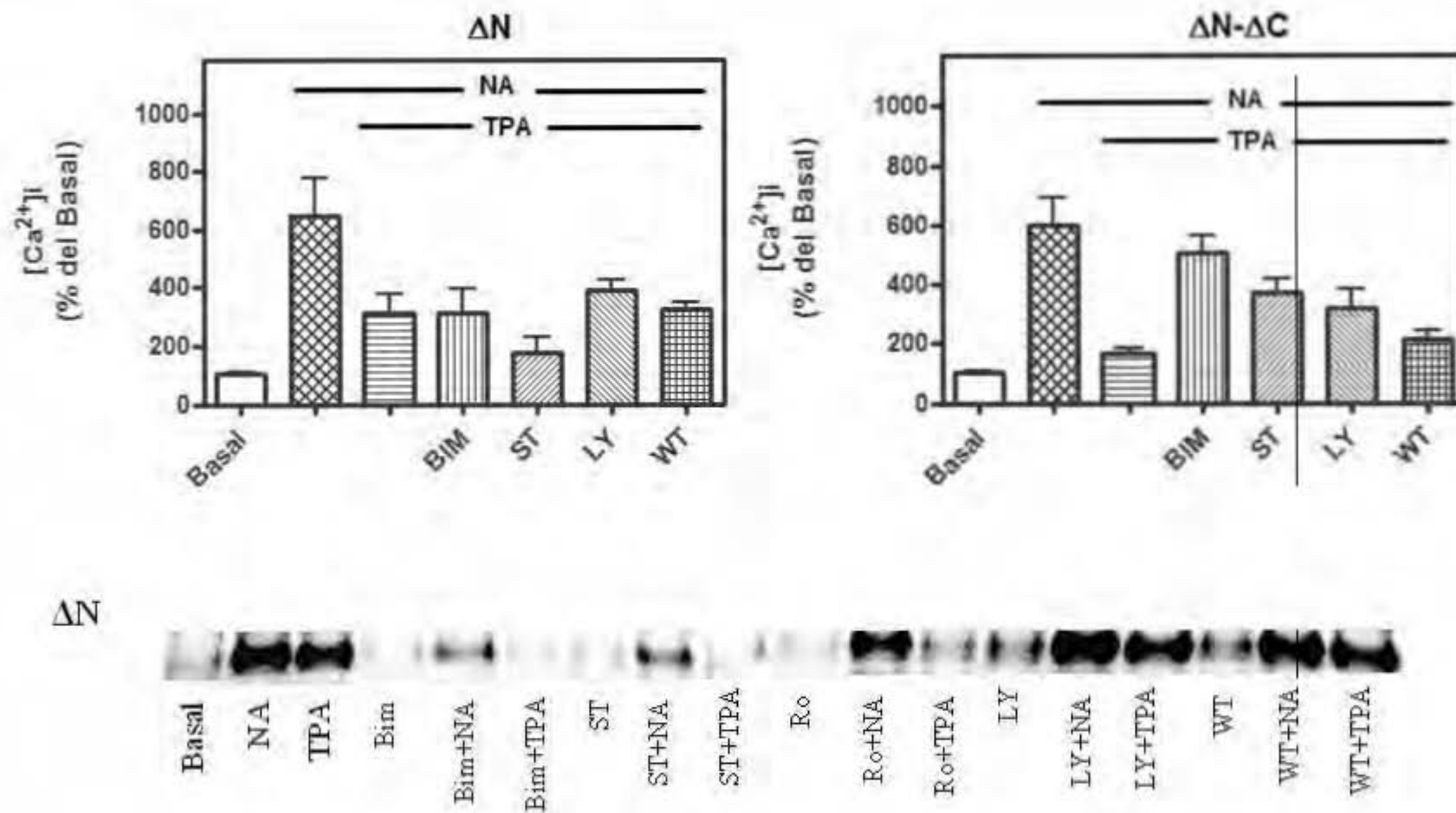
Vector de expresión pCEFL-HA. Los receptores adrenérgicos α_{1D} humanos ΔN y $\Delta N\Delta C$ fueron insertados entre los sitios de restricción NheI y EcoRI. El epítipo HA (YPYDVPDYA) se encuentra localizado entre BamHI y NheI, es decir, se encuentra del lado amino terminal del receptor. También se observa: la resistencia a ampicilina (Amp) y a neomicina (Neo), el origen de replicación (Ori) y el sitio de multiclonação (MCS). El plásmido fue otorgado por la Dra. Guadalupe Reyes-Cruz del CINVESTAV-IPN.

ANEXO II



Análisis de restricción de los plásmidos del RA- α_{1D} humano. En el panel izquierdo se muestra el plásmido purificado de la dos construcciones trucas del receptor, y en el panel derecho: el patrón de restricción con las enzimas BamHI y XbaI, lo que produjo dos fragmentos, el vector de 6kb y un inserto de 1482pb y uno de 1082pb, correspondientes al ΔN y al $\Delta N\Delta C$, respectivamente. Los marcadores de peso de 1kb y 1pb.

ANEXO III



Efecto de los inhibidores de las cinasa PKC y PI3K.

En el panel superior se muestra la liberación de calcio intracelular, izquierda la forma ΔN y a la derecha $\Delta N\Delta C$; y en el inferior autorradiografía de la fosforilación de ΔN en presencia de los inhibidores pre incubados 30 min

ANEXO IV

```

ADA1A_HUMAN -----MVFLSG 6
ADA1B_HUMAN -----MNPDLDTGHTS-----APARWQELKNAFTG 27
ADA1D_HUMAN HTFRDLLSVSTEGPRPDSAGGSSA GGGGGG3AGGAAPSEGPAUGGVP GGGAGGGGGVVGAG 80

                                TH1
ADA1A_HUMAN WADDS-SNCTQPF-----APVNRISKA IELGUILLEL ALGGLGMLLQILS 80
ADA1B_HUMAN PQQTS-SNSTLP-----QLDITRA ISVGLVLECAT ILFAIVGRIIVILS 89
ADA1D_HUMAN SGEDNRS SAGEPGSAGAGCDUNCTA AVGGLVUSAQEGUGVFLAAT ILMAVAGNLLVILS 120

                                TH1I
ADA1A_HUMAN QACNRHLNSVTHVYIUNLAVADELLTSTULPFSAIIFEULGYWAFGRVFCNINAAVDVLLCC 110
ADA1B_HUMAN QACNRHLRTPNHYFVUNLAVADELLSFTVLPFSAALEVULGYWVLCRIFCNINAAVDVLLCC 129
ADA1D_HUMAN QACNRHLQTVTHYIUNLAVADELLSSTULPFSSTHEVULGTWATGRAPCDVNAAVDVLLCC 180

                                TH1II
                                TH1III
ADA1A_HUMAN TASIAGLCIIEIDRYIGVSYPLRYP TIVTQRRGLMALLCVWALSLV ISIGPLFGWRQPAF 170
ADA1B_HUMAN TASILSLEAIEIDRYIGVRYSLQYP TLVTRRKAILALLSVVULSTV ISIGPLFGWRQPAF 189
ADA1D_HUMAN TASILELCTIEMDRYVGVVRSLSKYP AINTERKAAAILALLVWVWLVVSVGPIIGWRQPAF 240

                                TH1V
ADA1A_HUMAN EDETICQINEEPEYVLEPSALGSPYLEPLSIIILVHYCRUYVVAKRERGLKSGIKTKDSDE 230
ADA1B_HUMAN NDDKECGVTEEPYVALFSELSSTFYIPLAGIILVHYCRUYIVAKRTTKNLEAGVWRKEMENSK 249
ADA1D_HUMAN PDERFCGITEEAGVAUFSSVCSFVLPHAVIVVHYCRUYVVARSTTRSLEAGVWREREGKAS 300

                                TH1VI
ADA1A_HUMAN QVTLRIHRENAPAGGS---GNASAK---TKTHFSVRLLEFSREKKA AKTLGIIVUGGFULC 264
ADA1B_HUMAN ELTLRIHSENFHEDTL---SSTKAKGNHPRSSIAVKLTKFSREKKA AKTLGIIVUGGFILC 306
ADA1D_HUMAN QVNLRIHRCGAATGADGANGRRSAK GHTFSSISVRLIYFSREKKA AKTLGIIVUGGFULC 350

                                TH1VII
ADA1A_HUMAN WLPFFLVMPVIGSFFPDKFPSETVTPK IUDMLGYNLSCINPIIYPCSS QETKRAFQNVLRIQ 344
ADA1B_HUMAN WLPFFVIALPVGSLFSTLKPPDAGFKVUFMLGYPNSCLNPIIYPCSS KETKRAFVRLILGQQ 366
ADA1D_HUMAN WLPFFVVERIGSFFPQLKPSSEGVKVIIFMLGYPNSCLNPIIYPCSS RETKRAFRLRLRCQ 420

ADA1A_HUMAN CLCR---KQSSKHALG---YTLHP-----PSQAVEGQHKDMVRIPVGSRETFYRISK 390
ADA1B_HUMAN CRGRGRRRRRRRRLGGCAYTYRPTTRGGMLERSQARKDRLDDGGCLSGSQRTLPSASP 426
ADA1D_HUMAN CRRR-RRRRPLWRVYG---HHWRAS TSGLRQDCAPSSGDAPPGAPLALTALPDPDPEPPG 476

ADA1A_HUMAN TDG-----VCEWKPFS SMPRG SARITUSKDQSSCTTARVRSKSFLLQVCCCV 436
ADA1B_HUMAN SPGYLGRGAP-----PPVELCAFEWKAPGALLSLPAPEPPGRRGRHDSGPLTTFKLLT 480
ADA1D_HUMAN TPDMQAPVASRRKPPSAPREWRLLGPFRRPTTQLRAKUS-SLSHKIRAGGAQRAEAACAQ 535

ADA1A_HUMAN GPSTPPLD---KN---HQVPTIKVHTISLSENGEEV---- 466
ADA1B_HUMAN EPESFGTDGGASNGGCEAASADVANGQPGFKSNMPLAPGQF 520
ADA1D_HUMAN RSEVEAVSLGVPHEVAEGATCQAYELADYSNLRETDI--- 572

```

Alineamiento de los tres subtipos de receptores α_1 adrenérgico humanos.

La identidad en secuencia es de 60% entre α_{1D} y α_{1A} , 57% entre α_{1D} y α_{1B} y de 60% entre α_{1A} y α_{1B} . La alineación se realizó en www.uniprot.org con los siguientes número de acceso: P25100 (α_{1D}), P35348 (α_{1A}) y P35368 (α_{1B}).

Se destacan los sitios de fosforilación registrados en www.phosphosite.org para los α_{1A} y α_{1B} .

ANEXO V

Predicción sitios fosforilación para serina/treonina en el receptor α_{1D} adrenérgico humano

Predicción de Serinas en el COOH terminal:

Fosfo-serina	Secuencia consenso	Score
Ser406	YPCS <u>S</u> REFK	(0.936)
Ser441	HWRA <u>S</u> TSGL	(0.915)
Ser452	DCAP <u>S</u> SGDA	(0.987)
Ser492	RKPP <u>S</u> AFRE	(0.889)
Ser518	VSSL <u>S</u> HKIR	(0.967)
Ser537	CAQR <u>S</u> EVEA	(0.951)

Predicción de Serinas en el Tercera asa intracelular :

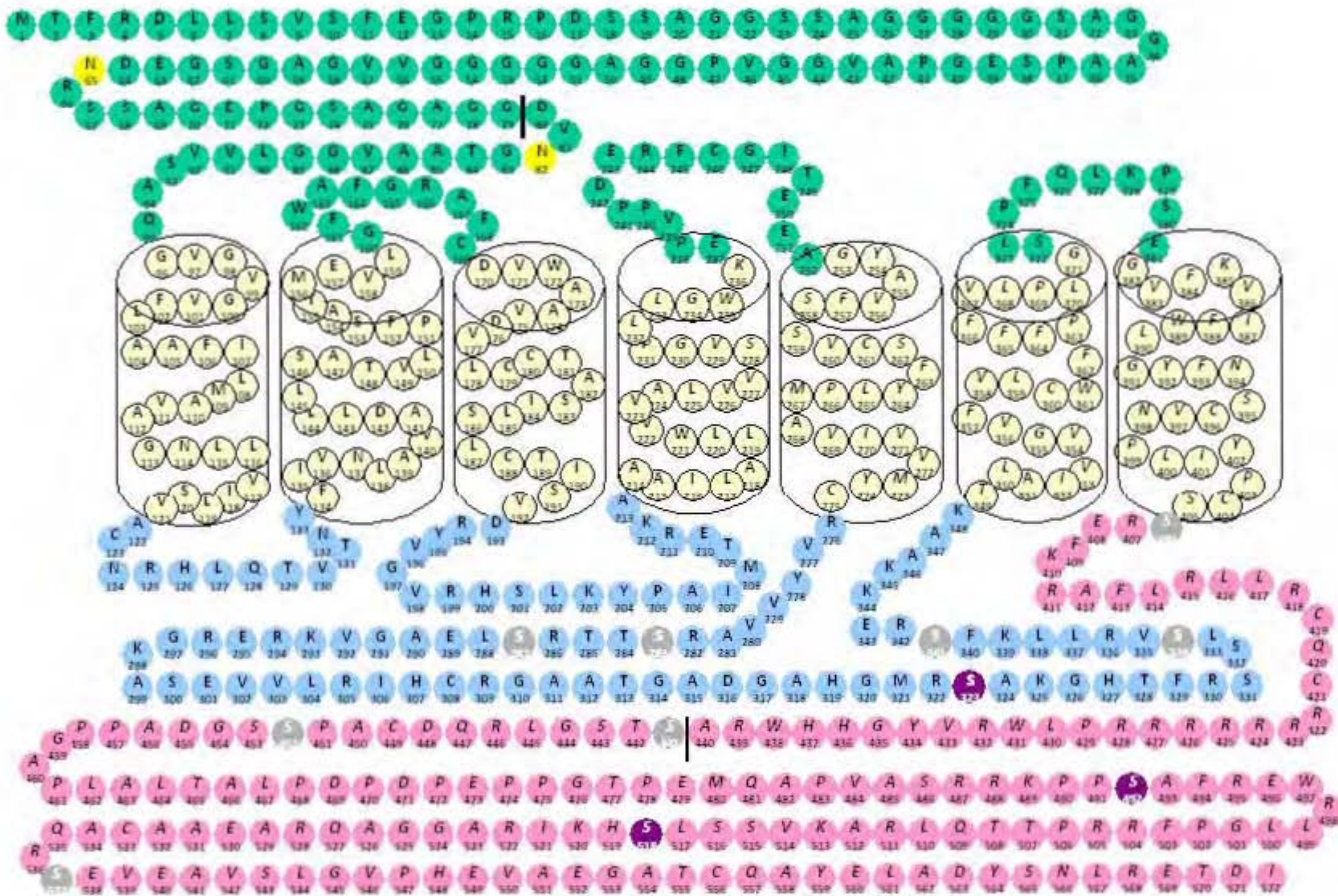
Fosfo-serina	Secuencia consenso	Score
Ser283	VVAR <u>S</u> TTRS	(0.961)
Ser287	STTR <u>S</u> LEAG	(0.991)
Ser323	HGMR <u>S</u> AKGH	(0.947)
Ser334	RSSL <u>S</u> VRLL	(0.960)
Ser341	LLKF <u>S</u> REKK	(0.943)

Secuencia consenso de fosforilación para PKC:

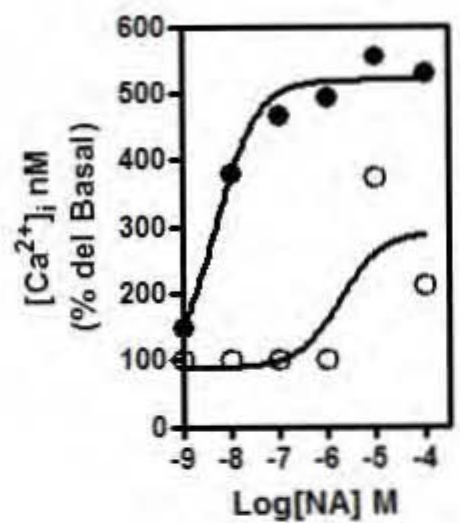
-(R/K)-(R/K)-X-(**S/T**)-B-(R/K)-(R/K)-

Análisis realizado en NetPhos2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/NetPhos>)

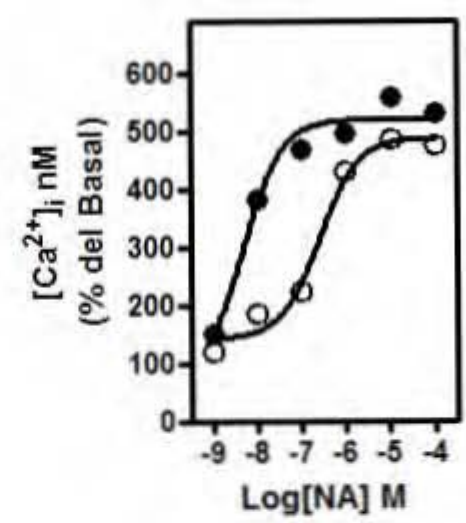
ANEXO VI



Estructura del Receptor Adrenérgico- α_{1D} humano. En morado se destacan los sitios probables de fosforilación por PKC, tanto en el extremo carboxilo terminal (rosa) como en la tercera asa intracelular (azul claro).



● NA
○ NA+ET



● NA
○ NA+BK