



2500551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Regulación funcional de los receptores α_{1a} -adrenérgicos por fosforilación.

Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

Biólogo Francisco Gabriel Vázquez Cuevas





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 en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz. El proyecto fue apoyado por donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT (27569N) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA (IN 205100).

Durante la realización del proyecto, el autor recibió una beca crédito del CONACyT (registro No. 129597) para estudios de maestría, y una beca complemento de la Dirección General de Estudios de Posgrado DGEP de la UNAM (OF. DGEP/SAP/PBN/1797/99).

Agradecimientos

Al Dr. J. Adolfo García Sáinz, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y por la dirección de esta tesis.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares por sus valiosas observaciones como parte del comite tutorial y del jurado de examen.

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por sus atinadas críticas como parte del comite tutorial.

A los miembros del jurado que atinadamente corrigieron y enriquecieron este trabajo:

Dra. Estela Sánchez de Jimenez

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Dr. José Pedraza Chaverri

Dr. Carlos Rosales Ledezma.

A la M. en C. Ma. Teresa Romero Ávila por su constante colaboración.

A la Dra. Claudia González Espinosa por su ayuda para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de los laboratorios 303 y 304 sur.

A las Auxiliares Guadalupe Jimenez e Ivonne Hernández.

Al personal del bioterio.

Indice

| | |
|---|-----|
| Indice..... | I |
| Abreviaturas..... | III |
| Resumen..... | 1 |
| Introducción..... | 2 |
| Receptores acoplados a proteínas G..... | 2 |
| Proteínas G..... | 4 |
| Activación de GPCR..... | 7 |
| Regulación cruzada de GPCR (<i>Cross Talk</i>)..... | 10 |
| Desensibilización..... | 11 |
| Desensibilización homóloga..... | 12 |
| Internalización de receptores..... | 12 |
| Proteínas cinasas de los receptores acoplados a proteínas G..... | 15 |
| Arrestinas..... | 16 |
| Desensibilización heteróloga..... | 17 |
| Receptores adrenérgicos..... | 18 |
| Importancia fisiológica de los receptores α_1 -adrenérgicos..... | 19 |
| Mecanismos de transducción..... | 20 |
| Regulación de receptores α_1 -adrenérgicos..... | 22 |
| Antecedentes..... | 25 |
| Hipótesis..... | 27 |

| | |
|--|-----|
| Objetivos..... | 28 |
| Planteamiento experimental..... | 29 |
| Materiales y Métodos..... | 31 |
| Resultados..... | 38 |
| Generación de anticuerpos contra el receptor α_{1d} -adrenérgico..... | 38 |
| Resumen del trabajo: <i>Phosphorylation and desensitization of</i> <i>α_{1d}-adrenergic receptors</i> | 43 |
| Phosphorylation and desensitization of α_{1d} -adrenergic receptors..... | 47 |
| Discusión | 94 |
| Conclusiones..... | 100 |
| Referencias..... | 101 |

Abreviaturas

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

NE: Norepinefrina

TPA: Tetradecanoil forbol acetato

GTP: Guanosin trifosfato

AMPc: Adenosin monofosfato ciclico

LPA: Ácido lisofosfatídico

GST: Glutación S transferasa

GRK: Cinasa especifica de los receptores acoplados a proteínas G

PKC: Proteína cinasa C

PKA: Proteína cinasa A

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa

PLC: Fosfolipasa C

IP3: Inositol trifosfato

DAG: Diacilglicerol

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

AA: Ácido araquidónico

Resumen

En el presente trabajo se estudió la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico de rata, así como su posible papel en el proceso de desensibilización. Se utilizaron fibroblastos Rat-1 que expresan de manera estable al receptor.

La generación de segundos mensajeros (concentración de calcio intracelular), y el pegado de un análogo no hidrolizable de GTP ($GTP\gamma S$) en respuesta a norepinefrina (NE) disminuyeron significativamente por la estimulación previa de los receptores con NE o por la activación farmacológica de la proteína cinasa C (PKC) con el ester de forbol tetradecanoil forbol acetato (TPA). Estos resultados sugieren que el receptor α_{1d} -adrenérgico se desensibiliza de manera homóloga y heteróloga.

El receptor se identificó por marcaje de fotoafinidad con prazosina yodada. En una electroforesis en condiciones desnaturalizantes migra principalmente como una banda de ~ 70 KDa. La inmunoprecipitación con un anticuerpo generado contra una proteína de fusión GST- α_{1d} , se estandarizó utilizando membranas fotomarcadas, hasta obtener al menos 80 % de rendimiento. La especificidad de los inmunoprecipitados se corroboró por western blot utilizando el anticuerpo contra la proteína de fusión GST- α_{1d} y además un anticuerpo comercial dirigido contra el decapeptido terminal del receptor α_{1d} -adrenérgico.

El receptor se encuentra fosforilado en condiciones basales, la estimulación con norepinefrina o TPA inducen un incremento significativo en la fosforilación (NE $10 \mu M$, 205 ± 13 %, $n=11$ y TPA $1 \mu M$, 269 ± 20 %, $n=10$). La fosforilación inducida por NE fue dosis dependiente con una EC_{50} de ~ 75 nM. El estudio del curso temporal demostró que el máximo se alcanza al minuto y después disminuye paulatinamente. La fosforilación dependiente de la activación de la PKC con TPA también fue dosis dependiente con una $EC_{50} \sim 25$ nM, pero fue un poco más lenta alcanzando su máximo a los 5 minutos y manteniéndose por lo menos durante una hora. La fosforilación por TPA fue sensible a inhibidores de la PKC, mientras que la inducida por NE no fue afectada por dichos inhibidores.

La activación de receptores endógenos de la línea celular utilizada, para endotelina, bradicinina y ácido lisofosfatídico indujo la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico, sugiriendo regulación cruzada de su actividad.

Esta es la primera demostración de que el receptor α_{1d} -adrenérgico de rata es sujeto de fosforilación por estímulo con su agonista norepinefrina y por activación de la proteína cinasa C. Esta fosforilación está relacionada con la desensibilización del receptor.

Introducción

Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son proteínas de membrana que median la acción de una amplia variedad de mensajeros tales como hormonas, neurotransmisores, neuropéptidos y estímulos físicos como la luz . Actualmente se conocen al menos 300 miembros de esta superfamilia de receptores, la similitud de secuencia de aminoácidos entre ellos es de 20 a 30 % para receptores de ligandos no relacionados y de 50 a 80% para receptores de ligandos comunes (Strader et al., 1994).

Los perfiles de hidropatía revelan la existencia de siete hélices transmembranales de 20 a 25 aminoácidos cada una en la estructura de estos receptores (hélices I a VII) lo que da lugar a la existencia de tres asas intracelulares y tres asas extracelulares (Bockaert, 1991), el extremo amino se localiza en el lado extracelular y el carboxilo en la región citosólica (Fig. 1), lo cual fue confirmado por el análisis de la estructura cristalina de la rodopsina bovina (Schertler, 1993) .

Se ha determinado la existencia de un puente disulfuro entre una cisteína de la región extracelular de la hélice III y una cisteína del asa extracelular 2 (E2) para varios tipos de receptores, incluidos el de rodopsina, el muscarínico de la acetilcolina y los adrenérgicos. El análisis de una base de datos con 200 secuencias reveló que el puente disulfuro parece existir en alrededor del 92 % de los receptores (Baldwin, 1993). Se ha propuesto que este enlace es importante en el plegamiento correcto de la proteína (Savarese et al., 1992) y que estabiliza la forma activa del receptor (Skiba, 1996).

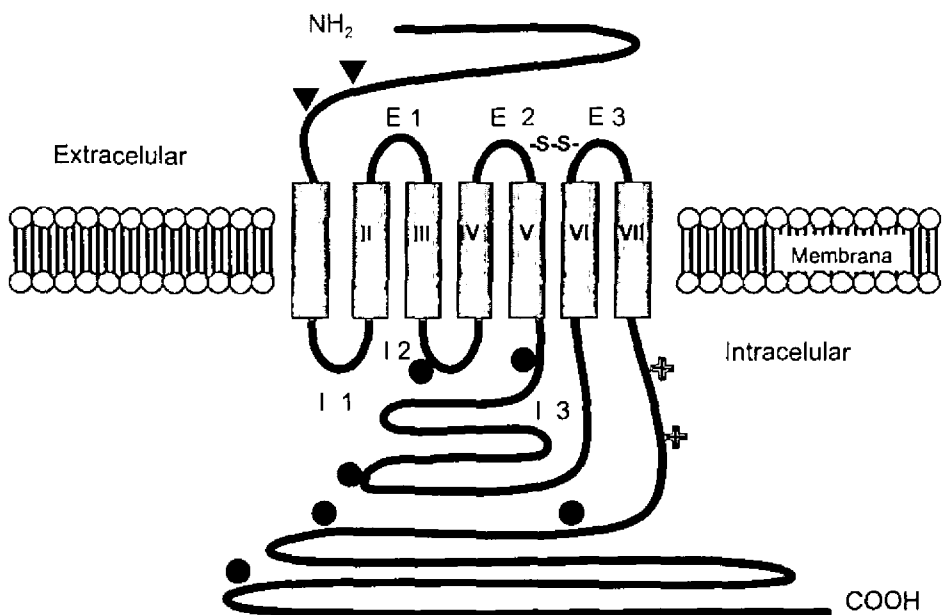


Fig. 1. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores tienen 7 hélices transmembranales (I-VII), que dan lugar a 3 asas intracelulares (I 1-3) y 3 asas extracelulares (E 1-3). En esta representación del receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico se muestran los sitios potenciales de fosforilación (●), los sitios de glicosilación (▼) y los sitios de palmitoilación (+).

Usando técnicas de mutagénesis y de unión a ligandos se demostró que el receptor β -adrenérgico interactúa con sus ligandos por medio de las cadenas laterales de varios aminoácidos pertenecientes a las hélices transmembranales, siendo los más importantes el aspártico 113 en la hélice transmembranal III (Strader, 1988 ; Strader, 1991), las serinas 204 y 207 en la transmembranal V y la fenilalanina 290 en la transmembranal VI (Strader, 1989). En estudios similares se

han demostrado interacciones equivalentes para el receptor muscarínico de la acetilcolina (Wess et al, 1993) y el receptor 5-HT_{1A} de la serotonina (Ho et al., 1992). Estas evidencias han demostrado que el sitio de interacción del receptor con su ligando es una estructura en forma de cesta delimitada por las siete hélices, la interacción involucra fuertemente a las hélices III, V y VI y en menor grado a las hélices II y IV (Baldwin, 1994).

Las regiones importantes en la interacción con las proteínas G incluyen el extremo cercano a la región intracelular de la hélice III (Cohen, 1993), el asa intracelular 3 (I3) (Parma, 1993), y la región cercana a la hélice VII del carboxilo terminal. Varias mutaciones en estas regiones producen fenotipos constitutivamente activos de los receptores y se ha propuesto que esto puede deberse a que las mutaciones aumentan la afinidad entre la proteína G y el receptor.

Por otra parte, la tercera asa citosólica y la región carboxilo terminal se han relacionado con el proceso de desensibilización de estos receptores, ya que en estas regiones existen residuos de serina y treonina que son sustratos de fosforilación de varias cinasas como la PKA, PKC y las cinasas específicas de receptores acoplados a proteínas G, GRKs. La fosforilación de estos residuos es la señal de inicio del proceso de desensibilización (Krupnick & Benovic, 1998), este aspecto se discutirá con detalle posteriormente.

Varios GPCR tienen residuos de cisteína en el extremo carboxilo terminal, para algunos de ellos se ha demostrado que la cisteína se palmitoila. Este lípido unido al receptor puede anclarse a la membrana dando lugar a una cuarta asa intracelular de la que no se conoce con claridad el papel funcional, pues la delección de estas cisteína no afectan la funcionalidad del receptor (Hilgenfeld, 1995).

Proteínas G

Las proteínas unidas a nucleótidos de guanina (proteínas G) forman una amplia familia de GTPasas que comprende a las proteínas G de bajo peso como Ras y Rho y también a las proteínas G heterotriméricas (Ham & Gilchrist, 1996). Estas últimas son las encargadas de transducir las señales de los receptores de siete dominios hacia el interior de la célula por medio de la activación de sus efectores.

La especificidad con la cual un receptor interacciona con un determinado subtipo de proteína G limita el rango de respuestas celulares que se activan al estimular al receptor (Neer, 1995). Sin embargo, es ampliamente conocido que un mismo receptor puede interactuar con dos o más subtipos de proteínas G, activando diferentes efectores. Por otro lado, la compartimentalización de los componentes de una determinada cascada de transducción en células especializadas también es un mecanismo que confiere especificidad a la activación de un receptor particular (Gudermann et al., 1996).

Las proteínas G heterotriméricas están compuestas por tres polipéptidos: la subunidad α que une e hidroliza GTP y el dímero $\beta\gamma$ donde las subunidades se encuentran fuertemente unidas entre sí y funcionalmente se comportan como una monómero.

Si la subunidad α está unida a GDP, el trímero formado con las subunidades $\beta\gamma$ es inactivo. Cuando la unión de un ligando activa al receptor, este sufre un cambio conformacional que lleva al intercambio de GDP por GTP en la subunidad α del heterotrímero. Una vez unida a GTP, la subunidad α adopta su conformación activa y se disocia el heterotrímero en $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$, ambos con actividad directa sobre diversos efectores. La actividad persiste hasta que el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α y entonces el heterotrímero se vuelve a asociar adoptando su estado inactivado (Hamm & Gilchrist, 1996) (Fig 2).

La subunidad $G\alpha$ comprende una familia de proteínas entre 39-52 KDa con una homología entre 45 y 80 %. Actualmente se conocen 23 diferentes. Con

base en su similitud de secuencia se han dividido en cuatro clases principales: $G_{\alpha s}$ que estimulan a la adenilato ciclasa y regulan la actividad de canales de calcio, $G_{\alpha i}$ que inhiben a la adenilato ciclasa, regulan canales de calcio y potasio y activan a la fosfodiesterasa de $GMPc$, $G_{\alpha q}$ que activan a la fosfolipasa C y $G_{\alpha 12}$ que regulan el intercambio sodio / potasio (Neer, 1995); varias G_{α} sufren

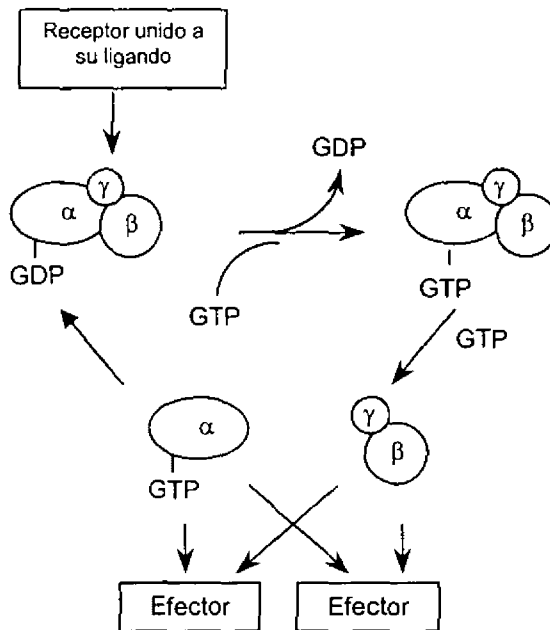


Fig. 2. Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas. Cuando el receptor es ocupado por su ligando, sufre un cambio conformacional que cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad alfa de la proteína G, este intercambio lleva a la separación del heterotrímero en dos componentes, la subunidad α , y el dímero $\beta\gamma$, ambos con actividad transduccional sobre diferentes efectores. La hidrólisis de GTP por la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α , induce el reensamble del heterotrímero, regresando con esto a su conformación inactiva.

modificaciones postraduccionales como miristoilación y palmitoilación y se ha postulado que estas modificaciones afectan su anclaje a la membrana plasmática (Wedegaertner et al., 1995). También se ha propuesto que algunos subtipos de $G\alpha$ son regulados por fosforilación, modificación que puede estar modulando su actividad (Moyers, 1995 ; Fields, 1995).

Las subunidades $\beta\gamma$ forman un dímero fuertemente unido, sólo se disocia en condiciones de desnaturalización, este dímero es capaz de activar a diversos efectores. También se le ha involucrado con el reclutamiento a la membrana de cinasas específicas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) (Neer, 1994 ; Neer, 1995). Se conocen cinco subunidades β en mamíferos las cuales tienen una homología de entre 35 y 90 % (Watson et al., 1994). En contraste las seis subunidades γ presentan una bajo porcentaje de homología. Cinco diferentes subunidades β y al menos seis γ podrían formar 30 diferentes combinaciones, sin embargo hasta ahora sólo se ha demostrado la existencia de algunas de las combinaciones posibles (Schmidt et al., 1992)

El dímero $\beta\gamma$ puede regular de manera específica la actividad de diferentes subtipos de adenilato ciclasa (Gilman & Tang, 1991), regula positivamente el canal muscarínico de potasio (Logothetis et al., 1987), a las fosfolipasas $C\beta$ ($PLC\beta$) y A2, a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y a la GRK 2 (Clapman & Neer, 1993). También se ha demostrado que a través de Ras puede participar en la activación de la vía de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Crespo et al., 1994).

De acuerdo con el panorama descrito, los posibles efectores activados por las proteínas G son variados, y en ocasiones confluyen en un mismo sistema. Esto plantea la necesidad de mecanismos de regulación altamente específicos. Por ejemplo, la regulación de la actividad de las isoformas de la adenilato ciclasa es altamente especializada: un subtipo de esta enzima es activado por $G\alpha$ y no es afectado por $G\beta\gamma$, un segundo subtipo es activado de manera sinérgica por $G\alpha$ y por $G\beta\gamma$, y una tercer isoforma es activada por $G\alpha$ e inhibida por $G\beta\gamma$ (Tang & Gilman, 1991). Así mismo, la fosfolipasa C tiene diferentes patrones de

regulación: PLC γ no es activado por ninguna subunidad de proteínas G, mientras que PLC β puede ser activada independientemente por G α y por G $\beta\gamma$ (Smrcka & Sternweis, 1993).

Activación de GPCR

Observaciones realizadas por Lefkowitz y colaboradores con receptores mutados que presentaban un fenotipo de actividad constitutiva (Lefkowitz et al., 1993; Samana et al., 1993) les llevó a proponer el "modelo del complejo ternario" para la activación de estos receptores. En este modelo, el receptor se encuentra en un equilibrio entre dos conformaciones, la inactiva R y la activa R*, en el cual solamente R* interactúa con la proteínas G. La unión de un agonista modifica el equilibrio favoreciendo al estado R* y estabiliza un complejo ternario formado por el agonista (A), el receptor activo R* y la proteína G (AR*G), que finalmente resulta en la activación de la proteína G. Considerando este modelo se asume que los agonistas tienen una alta afinidad por R* y su acción es incrementar el cociente R*/R, mientras que los agonistas inversos presentan alta afinidad por la forma R disminuyendo el cociente R*/R y finalmente los antagonistas neutros tienen igual afinidad por ambas formas y no modifican el equilibrio entre R* y R (Gudermann et al., 1996).

Trabajando con la rodopsina Hofman ha propuesto un modelo de GPCR con múltiples conformaciones del estado activo (Hofmann et al., 1995, el cual puede explicar la activación de múltiples efectores por GPCR. En este modelo, las diferentes conformaciones inducidas por la unión de un ligando difieren en su habilidad para acoplar proteínas G y, por lo tanto, estabilizan diferentes complejos ternarios, llevando a la activación de diferentes proteínas G. También es posible proponer que diferentes ligandos estabilizan diferentes complejos ternarios (Gudermann et al., 1996). Estudios realizados con mutantes del receptor para tirotrópina humano y con el receptor PACAP (adenilil cyclase - activating polypeptide (Chatterjee et al., 1995) apoyan este modelo (Fig 3).

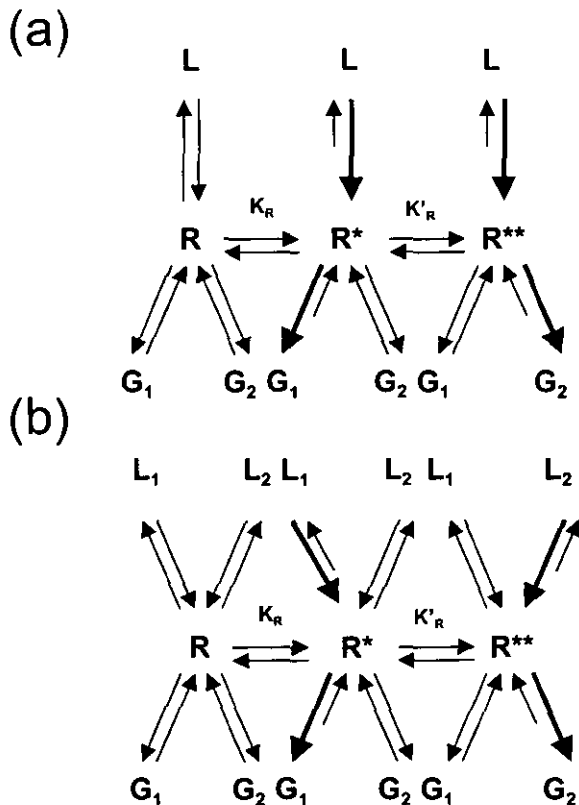


Fig. 3. Modelo hipotético de activación de receptores acoplados a proteínas G. El receptor presenta una conformación inactiva (R) y dos activas (R* y R**). Una determinada conformación determina el acoplamiento preferencial a una u otra proteína G (G1 vs G2). (A) cuando interactúa con un ligando y (B) cuando interactúa con dos ligandos, en este caso, cada ligando estabiliza preferencialmente una cierta conformación del receptor. Todas las posibles conformaciones existen simultáneamente en equilibrio con las otras, bajo la constante K_R , para la distribución de receptores entre R y R*, y K'_R para la distribución entre R* y R** (Tomado de Gudermann, Kalkbrenner y Schultz, 1996).

Regulación cruzada de GPCR (Cross talk)

La regulación cruzada o *cross talk*, es la regulación funcional de un receptor como consecuencia de la actividad de un receptor distinto. Así, la estimulación de un receptor activa una determinada vía de transducción, cuyos componentes pueden interactuar con los activados por otro GPCR o por un receptor con actividad de tirosina cinasa (Selbie & Hill, 1998). Esta interacción puede llevar a una regulación positiva, donde dos receptores funcionan de manera sinérgica, o a una regulación negativa, donde la activación de un receptor atenúa la actividad del otro.

El funcionamiento sinérgico de dos receptores puede reflejarse en un parámetro fisiológico. Por ejemplo, los vasos sanguíneos pueden ser hipersensibilizados a noradrenalina con un pretratamiento con neuropéptido Y. Este pretratamiento amplifica la respuesta contráctil (Edvinsson, 1984). En este caso la acción de los receptores α_1 -adrenérgicos acoplados a $G_{\alpha q}$ es potenciada por receptores acoplados a $G_{\alpha i}$. Se sabe que la PLC es un efector principal de los receptores acoplados a G_q y se ha propuesto que el dímero $G\beta\gamma$ de G_i activa de manera directa a la PLC (Koch et al., 1994). La consecuencia del aumento en la actividad de la PLC es una mayor liberación de calcio intracelular, y por ende de la contracción muscular. Por otra parte, se ha demostrado regulación positiva entre receptores acoplados a $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha q}$, en este caso la estimulación de receptores acoplados a $G_{\alpha q}$ como los α_1 -adrenérgicos potencia la respuesta de los receptores β_2 -adrenérgicos medida como producción de AMP-cíclico (Palacios et al., 1978). En este caso, la activación de la PKC en la cascada de señalización de $G_{\alpha q}$ estimula la actividad de algunas isoformas de adenilato ciclasa, efecto que sería aditivo con la activación de la ciclasa por $G_{\alpha s}$.

Un ejemplo de la regulación negativa se da entre los receptores acoplados a $G_{\alpha q}$. La cascada de transducción de estos GPCR lleva a la activación de la PKC, la cual es capaz de fosforilar a varios GPCR, desensibilizándolos. De este modo, la activación de receptores ET1 para endotelina conduce a la fosforilación

del receptor α_{1b} -adrenérgico y también a su atenuación funcional (desensibilización) (Vázquez-Prado et al., 1997).

Estos ejemplos evidencian que en la célula el mantenimiento de la homeostasis implica la integración de toda la información al mismo tiempo e implica la existencia de mecanismos de regulación fina de procesamiento de la información.

Desensibilización

La estimulación prolongada de receptores de siete dominios por sus agonistas resulta en una atenuación de su respuesta, proceso al que se le conoce como desensibilización. Es un mecanismo de regulación muy importante para controlar la respuesta celular promovida por la estimulación de un receptor; puede estar participando en la terminación de un estímulo individual o bien modulando la capacidad de respuesta de la célula a estímulos posteriores. Existen varios niveles en la desensibilización de un receptor que comprenden desde un desacoplamiento de su proteína G característica, hasta una disminución en el número de receptores en la membrana relacionada con secuestro y degradación de éstos ("down regulation"). La fosforilación de receptores parece ser un evento inicial en la desensibilización. La fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G la realizan dos tipos de cinasa; las GRKs (G Protein coupled Receptor Kinases), específicas para los receptores acoplados a proteínas G (Premont et al., 1995); y las activadas por segundos mensajeros como la PKC dependiente de diacilglicerol (DAG) y la PKA que es activada por AMPc (Bouvier, 1987).

En cuanto a los mecanismos que la producen la desensibilización de receptores puede ser: homóloga cuando es desencadenada por el acoplamiento su propio ligando en un proceso específico para el receptor; o heteróloga si dicha desensibilización es una consecuencia de la activación de una vía de señalización independiente del receptor. Estos dos tipos de desensibilización

pueden presentar varias diferencias tales como la velocidad, el grado de atenuación y la duración (Loshe, 1993).

Desensibilización homóloga

La desensibilización homóloga o ligando-específica es un proceso rápido que depende de la fosforilación del receptor por GRKs. Estas cinasas fosforilan receptores en residuos de serina y treonina del carboxilo terminal y de la tercera asa intracelular solamente cuando están ocupados por su agonista, es decir, en su forma activada (Premont et al., 1995). La fosforilación es una señal de reconocimiento para proteínas como las β -arrestinas que al acoplarse evitan la interacción del receptor con la proteína G, lo cual funcionalmente es un estado ya desensibilizado (Benovic et al., 1987). Esto inicia la internalización del receptor por una vía endocítica dependiente de vesículas cubiertas de clatrina (Zhang et al., 1996). Cabe mencionar que las arrestinas se asocian específicamente a receptores en estado activado y fosforilados por GRK. Ya se han mapeado los dominios de reconocimiento de estado activado y de reconocimiento del receptor fosforilado (Wu et al., 1997).

Internalización de receptores

Se ha demostrado claramente la translocación de GPCR de la superficie celular a compartimentos intracelulares. Estudios pioneros de unión de radioligandos con el receptor β_2 -adrenérgico demostraron una progresiva disminución en el pegado de alta afinidad de agonistas conforme transcurre el ensayo, lo cual sugirió una disminución en el número de receptores membranales (Pittman & Molinoff, 1980). Posteriormente se demostró por medio de fraccionamiento en gradientes de densidad de sucrosa, que los receptores internalizados se encontraban asociados a vesículas ligeras que no eran positivas para marcadores de membrana

plasmática y que mostraban propiedades hidrodinámicas y de permeabilidad distintas a la membrana celular (Harden et al., 1980; Waldo et al., 1983). Además, se demostró que la internalización del receptor β -adrenérgico dependía solamente del acoplamiento con el agonista, y que ocurría de manera rápida ($t_{1/2} \sim 2$ min) (Waldo et al., 1983). Varias evidencias sugieren que el secuestro de este receptor a vesículas intracelulares ocurre por una vía endocítica dependiente de clatrina (Chuang et al., 1980; Hertel et al., 1985) que es utilizada por otros receptores, como los receptores de transferrina (Wakshull et al., 1985). Se ha demostrado el secuestro de varios receptores acoplados a proteínas G a vesículas intracelulares, inducido por el acoplamiento de un agonista. Por ejemplo, varios receptores metabotrópicos de la acetilcolina (mACh) (Koenig & Edwarson, 1996), μ - y δ -opioides (Keith et al., 1996), 5HT- $_{2A}$ serotoninérgico (Berry et al., 1996) y α_{1b} -adrenérgico (Fonseca et al., 1995) se internalizan por vesículas cubiertas de clatrina.

Recientemente, se ha establecido que la fosforilación dependiente de GRK es necesaria para la internalización. Experimentos con el receptor muscarínico m2 evidenciaron que la sobreexpresión de GRK-2 induce la internalización del receptor (Tsuga et al., 1994). Aunque la internalización contribuye a la desensibilización, quizá su mayor relevancia fisiológica sea promover la resensibilización de receptores. La resensibilización consiste en la recuperación de la capacidad de respuesta de un receptor después de haber sido desensibilizado por acción de un ligando. Estudios realizados utilizando al receptor β_2 -adrenérgico (Pippig et al., 1995) han permitido proponer que la internalización restaura su función por activación de una fosfatasa específica, que desfosforila a estos receptores (Pitcher et al., 1995). Una vez desfosforilados los receptores regresan a su estado preactivado y entonces son reciclados a la membrana plasmática (Fig.4).

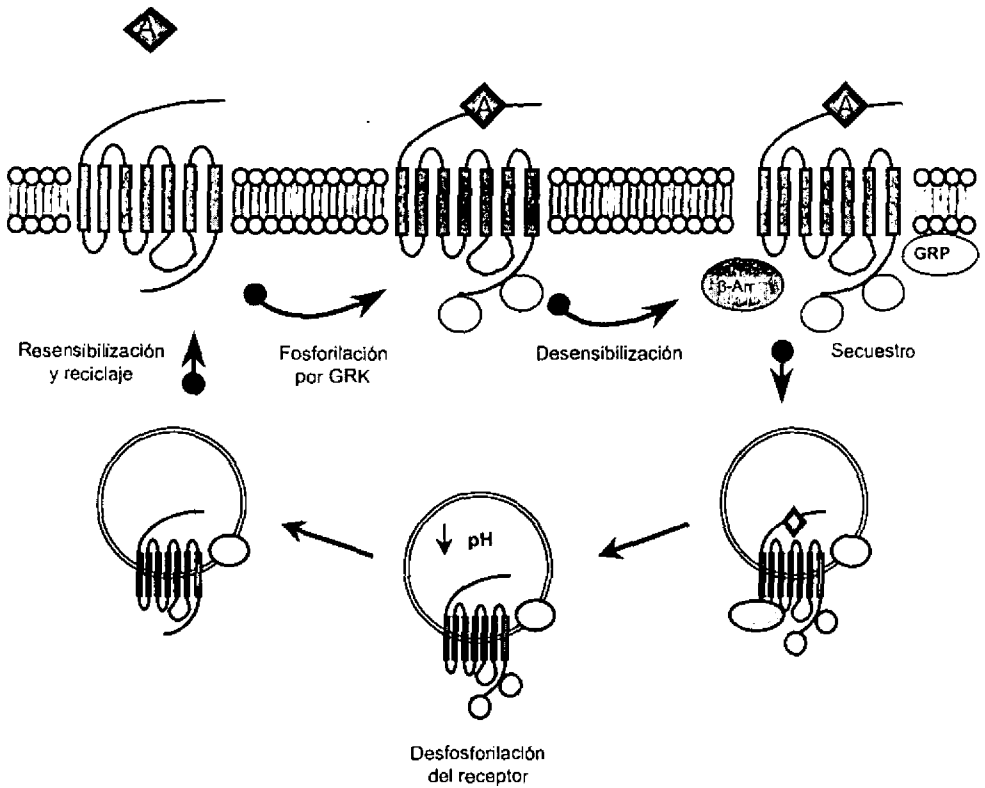


Fig. 4. Modelo de desensibilización, secuestro y resensibilización del receptor β_2 -adrenérgico. Una vez que el agonista se une, el receptor es inicialmente desensibilizado por fosforilación dependiente de GRK y acoplamiento de la β -arrestina. La β -arrestina unida al receptor interacciona con vesículas cubiertas de clatrina y el receptor sufre endocitosis. La acidificación del endosoma promueve la asociación del receptor con una fosfatasa específica de los receptores acoplados a proteína G (GRP) y consecuentemente el receptor es desfosforilado. El receptor finalmente es reciclado a la membrana plasmática (modificado de Krupnick y Benovic, 1998).

Proteínas cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs).

La familia de las GRKs comprende al menos seis proteínas cinasas que fosforilan específicamente a los receptores acoplados a proteínas G en residuos de serina y treonina. Las primeras GRKs que se descubrieron fueron la rodopsina cinasa o GRK1 y la cinasa del receptor β - adrenérgico (β ARK) ó GRK2 (Benovic et al., 1986). Ambas enzimas fosforilan a los receptores exclusivamente en su forma activada. La identidad de secuencia de aminoácidos entre estas dos enzimas es de ~33% y la similitud de ~58% (Krupnick & Benovic, 1998).

A principios de los 90s fueron descubiertas otras cuatro GRKs. β ARK2 (GRK3), IT11 (GRK4), GRK5 y GRK6. Todas las GRKs tienen una organización estructural similar con un extremo N-terminal de ~185 aminoácidos pobremente conservado, un dominio catalítico de ~270 aminoácidos muy conservado, y un extremo carboxilo de tamaño variable, entre 105 y 230 residuos (Krupnick & Benovic, 1998). Respecto a su distribución β ARK, β ARK2, GRK5 y GRK6 son ubicuas, mientras que GRK4 se expresa predominantemente en el testículo. La actividad de β ARK y β ARK2 es regulada por el complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G (Haga & Haga, 1992), el sitio específico de unión de $G\beta\gamma$ a la GRK ha sido localizado en una pequeña región del carboxilo terminal. Las otras GRKs sufren modificaciones que las permiten asociarse a la membrana, lo cual es crítico para su acción. La rodopsina cinasa es farnesilada (Anant & Fung, 1992), la GRK4 y GRK6 son palmitoiladas (Stoffel et al., 1994) y la GRK5 se une a fosfolípidos (Kunapuli et al., 1994). En el caso de la GRK6 la palmitoilación es necesaria para que pueda fosforilar al sustrato (Loudon & Benovic, 1997).

Estudios recientes han demostrado que las GRKs son reguladas por fosforilación vía PKC. La fosforilación por PKC activa a la GRK2 (Chuang et al., 1995). En contraste la GRK5 es regulada negativamente al ser fosforilada por PKC. Por otra parte la calcio calmodulina inhibe a varias GRKs, específicamente a GRK5, GRK6, GRK2 y rodopsina cinasa (Krupnick & Benovic, 1998).

Arrestinas

Las arrestinas son una familia de proteínas que actúan junto con las GRKs para bloquear una vía de señalización dependiente de receptores acoplados a proteínas G. La arrestina prototípica es una proteína de 48-kDa, originalmente llamada antígeno S actualmente denominada arrestina visual por su distribución limitada a fotorreceptores (Pfister et al., 1985). Posteriormente fue clonada otra proteína arrestina específica de la retina con ~50 % de identidad en secuencia de aminoácidos con la primera y de distribución limitada a los fotorreceptores de cono, así, se le llamó arrestina del cono. Lohse et al. (1990), clonaron la β -arrestina, una arrestina no visual cuyo cDNA codifica una proteína de 418 aminoácidos y es altamente homóloga a la arrestina prototípica. Subsecuentemente se clonó la segunda arrestina no visual de cerebro de bovino, de tiroides humana y de cerebro de rata, denominada β -arrestina2 o arrestina 3, el cDNA corresponde a una proteína de 409 aminoácidos. En general, las arrestinas son 45% idénticas y tienen una similitud del 75% entre los residuos 16 y 349 de la arrestina visual. La β -arrestina y la β -arrestina2 son ubicuas (Lohse et al., 1990).

Tanto las arrestinas visuales como las β -arrestinas se asocian exclusivamente a los receptores activados y fosforilados. Muchas evidencias señalan que desempeñan un papel muy importante en la desensibilización de receptores asociándose al receptor fosforilado, bloqueando así su interacción con la proteína G. En experimentos de reconstitución utilizando al receptor β -adrenérgico fosforilado y a la β -arrestina se demostró una inhibición del 50% en la activación de Gs. Es importante destacar que la habilidad de la β -arrestina para inhibir el acoplamiento del receptor β -adrenérgico con Gs aumentó cuando el receptor era fosforilado por GRK2, pero no por PKA (Lohse et al., 1992). Esto establece la especificidad de la maquinaria GRK-arrestina en la desensibilización homóloga de los receptores β -adrenérgicos. Este mecanismo se ha demostrado

en la desensibilización de otros GPCR como el β_1 -adrenérgico y el α_{1b} -adrenérgico (Diviani et al., 1996).

Desensibilización heteróloga

Los receptores acoplados a proteínas G pueden ser fosforilados por las cinasas dependientes de sus efectores, como la cinasa dependiente de cAMP (PKA) y la cinasa regulada por calcio y diacilglicerol (PKC). Esta fosforilación ejerce una regulación negativa sobre la actividad del receptor. Al mismo tiempo trae consigo una desensibilización generalizada y no específica. La activación de una cinasa dependiente de segundos mensajeros por cualquier vía puede llevar a la desensibilización de un receptor que sea sustrato de fosforilación. Por esta razón este proceso ha sido llamado desensibilización heteróloga (Lohse, 1993).

Se ha demostrado que el receptor β_2 -adrenérgico posee dos sitios potenciales de fosforilación para PKA en la región intracelular, uno en la tercera asa y otro en el carboxilo terminal (Blake et al., 1987). Estos sitios son importantes para la interacción con la proteína Gs y se ha demostrado, utilizando sistemas reconstituidos, que la fosforilación de dichos sitios es suficiente para disminuir el acoplamiento con la proteína G (Pitcher et al., 1992). La fosforilación de los mismos sitios por PKC tiene efectos similares a los mediados por PKA. La β -arrestina interactúa débilmente con residuos fosforilados por PKC o PKA, por lo que la desensibilización dependiente de estas cinasas se considera independiente de arrestinas (Pitcher et al., 1992).

En células intactas se ha observado que la desensibilización del receptor β_2 -adrenérgicos dependiente de PKA es comparable en magnitud a la mediada por GRK2 (40-50% vs 50-70% de disminución de la respuesta), sin embargo es considerablemente más lenta y más sensible a la concentración de agonistas (Lohse et al., 1990).

La desensibilización de receptores por activación de PKC se ha demostrado para varios receptores, por ejemplo el de trombina, 5-HT de serotonina y el receptor de angiotensina-II (Lohse, 1993).

Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos son miembros de la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G; sus agonistas naturales son las catecolaminas: adrenalina y noradrenalina. La familia de receptores adrenérgicos comprende nueve productos génicos: tres β (β_1 , β_2 , β_3) acoplados a proteínas $G_{\alpha s}$, tres α_2 (α_{2-c10} , α_{2-c24} , α_{2-c2}) acoplados a proteínas $G_{\alpha i}$ y tres α_1 acoplados a proteínas $G_{\alpha q}$ y por lo tanto al recambio de fosfoinosítidos-calcio (Cotecchia et al. 1998).

Los subtipos de receptores α_1 adrenérgicos que se han clonado son α_{1a} , α_{1b} y α_{1d} con sus correspondientes homólogos farmacológicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} (Michel et al., 1995). Farmacológicamente se ha sugerido un cuarto subtipo con baja afinidad por prazosina, al que se le ha denominado α_{1L} , sin embargo su cDNA no ha sido clonado (Muramatsu et al., 1990). Recientemente se ha demostrado que el receptor α_{1a} presenta varias formas de *splicing* alternativo indistinguibles farmacológicamente, cuya característica principal es que son receptores truncados que carecen de la séptima hélice transmembranal, sin embargo no se conoce su relevancia fisiológica (Chang et al. 1998 ; Cogé et al. 1999). De los subtipos α_{1b} y α_{1d} se conoce una forma única.

El receptor α_{1d} -adrenérgico (Fig. 1) es una polipéptido de 560 aminoácidos con un peso molecular de 59717 daltones, tiene dos sitios de glicosilación Asn60 y Asn76; un enlace disulfuro entre las asas extracelulares dos y tres (Cys163 - Cys240); dos sitios de palmitoilación en Cys413 y Cys 415 ; no posee sitios de fosforilación para PKA pero si para PKC en Ser 195 (segunda asa intracelular), Thr278 y Thr322 (tercer asa intracelular) y Ser424, Ser448 y Ser480 en el carboxilo terminal (Watson & Arkininstall, 1994).

Importancia fisiológica de los receptores α_1 -adrenérgicos

Estos receptores están presentes en muchos tejidos incluyendo cerebro, corazón, arterias, hígado, riñón, próstata y bazo. Participan en muchos procesos fisiológicos esenciales como la neurotransmisión a nivel central y periférico, regulación del ritmo cardíaco, modulación del metabolismo hepático, modulación del tono vascular y contracción del músculo liso en el sistema genito-urinario (García-Sáinz et al., 2000).

La distribución de subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en diferentes tejidos presenta gran variabilidad entre especies. Es importante hacer notar estas diferencias pues los datos obtenidos en una especie no son siempre extrapolables a otras; por ejemplo , en el hígado de rata se expresa predominante el mRNA del receptor α_{1b} (Rokosh et al., 1994) mientras que en el hígado humano el subtipo predominante es el α_{1a} (García-Sáinz et al., 1995). En el humano el mRNA del subtipo α_{1a} humano es predominante en corazón, cerebelo, corteza cerebral y próstata (Price et al., 1994). Los vasos deferentes y otros músculos lisos expresan predominantemente el α_{1a} y α_{1d} (Piascik et al., 1997). El subtipo α_{1b} predomina en riñón y bazo y el α_{1d} en la aorta.

Por su importancia fisiológica su disfunción ha sido ligada a varios padecimientos como la hiperplasia prostática benigna (Schwin & Kwatra, 1998), la hipertrofia cardíaca (Simpson, 1983) y la hipertensión (Ibarra et al., 1998). El receptor α_{1d} se expresa de manera funcional en arterias como la aorta, iliaca, carótida, mesentérica, femoral y renal (García-Sáinz et al. 1999). Se ha sugerido que este subtipo de receptores es el más importante en la regulación del tono vascular periférico y que está relacionado con padecimientos vasculares como la hipertensión. Recientemente se ha demostrado que la contracción arterial en ratas hipertensas está mediada primordialmente por receptores α_{1d} -adrenérgicos adrenérgicos y se ha propuesto que están involucrados en el mantenimiento de esta patología (Villalobos-Molina & Ibarra, 1996). El estudio de la modulación

funcional de los receptores α_1 -adrenérgicos es de gran interés fisiológico y tiene perspectivas terapéuticas.

Mecanismos de transducción

Los receptores α_1 -adrenérgicos se acoplan a proteínas $G_{q/11}$, insensibles a toxina pertussis. La familia de proteína $G_{q/11}$ comprende cuatro subunidades α : α_q y α_{11} de distribución ubicua y α_{14} y α_{16} de distribución limitada. Los tres subtipos de receptores pueden acoplarse a $G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$, los receptores α_{1a} y α_{1b} pueden hacerlo con $G\alpha_{14}$ y sólo el subtipo α_{1b} se acopla con $G\alpha_{16}$ (Wu et al., 1992).

El efector principal de las proteínas $G_{q/11}$ es la fosfolipasa C- β (PLC- β). La PLC hidroliza al fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato liberando DAG e IP_3 . El acoplamiento del IP_3 a su receptor en el retículo endoplásmico provoca la liberación de calcio intracelular, y sinérgicamente con el DAG, activa a la proteína cinasa C (PKC). También pueden mediar el incremento de AMPc por activación de adenilato ciclasa vía PKC (Fig.5) (Perez et al., 1993).

La estimulación de estos receptores también lleva a la activación de la fosfolipasa A_2 , llevando a la liberación de ácido araquidónico. Esta activación es mediada principalmente por la movilización de calcio intracelular y por el acoplamiento al receptor de proteínas G sensibles a toxina pertussis dependiendo del tipo celular (Perez et al. 1993). Los tres subtipos α_1 -adrenérgicos activan a la fosfolipasa D llevando a la liberación de ácido araquidónico, esta actividad es sensible a la quelación de Ca^{2+} extracelular (Fig .5) (Llahi & Fain, 1992).

Otra respuesta celular activada por estos receptores es la entrada de calcio a la célula. En miocitos de la vena portal, está mediada por la activación de canales independientes de voltaje e insensibles al bloqueador dihidroxi piridina (Minneman, 1988). No obstante Zhang et al. (1998) han demostrado que en miocitos del ventrículo de rata la estimulación de receptores α_1 -adrenérgicos produce corrientes de Ca^{2+} tipo L, sensibles a dihidroxi piridina, y dependientes de PKC.

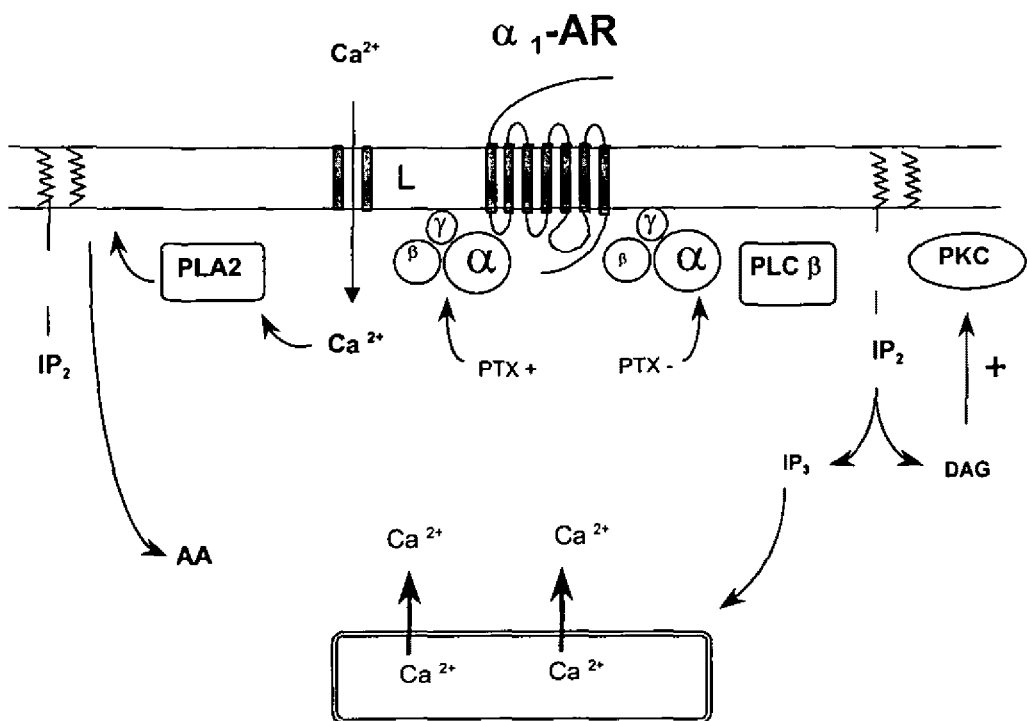


Fig. 5. Vías de transducción que activa el receptor α_{1a} -adrenérgico (ver texto).

Los receptores α_1 -adrenérgicos, al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, activan respuestas mitogénicas en varios tipos celulares, jugando un papel importante en la regulación del crecimiento y la proliferación celular (revisado por Zhong & Minneman, 1999). Utilizando cultivos de miocitos del ventrículo de ratas neonatas se ha demostrado que los agonistas α_1 -adrenérgicos norepinefrina y fenilefrina inducen hipertrofia (LaMorte et al., 1994). Además, la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo del receptor α_{1b} -adrenérgico en miocitos cardíacos, induce hipertrofia en animales transgénicos (Milano et al., 1994). Diversos estudios han investigado las vías de señalización

que intervienen en la hipertrofia cardíaca mediada por receptores α_1 -adrenérgicos, y se ha demostrado la activación de varias proteínas de la vía de la cinasa activada por mitógenos (MAPK). Thourbon &Thourbon (1994) demostraron la participación de la proteína G de bajo peso Ras, GTPasa que participa en la activación de la vía de las MAPK por receptores a factores de crecimiento. La activación de Ras fue sensible a genisteína, lo que implica fosforilación en tirosina. Zechner et al., (1997) demostraron que en la hipertrofia se activan las MAPK p38 y en menor medida la cinasa del amino terminal de Jun; específicamente, un inhibidor de la MAPK p38 bloquea la hipertrofia inducida por el agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina.

En estudios del crecimiento del músculo liso arterial mediado por catecolaminas se ha demostrado que la hipertrofia de este tejido está mediada por el receptor α_{1d} - adrenérgico. Esta respuesta involucra la activación de las MAPK p42-p44 pues la hipertrofia mediada por receptores α_{1d} , es bloqueada por el inhibidor específico de MAPK, PD98059 (Xin et al., 1997).

En células PC12 se ha demostrado que el receptor α_{1a} es capaz de activar a la ERK (*extracelular signaling regulated kinases*). También activa las rutas de la cinasa del amino terminal de Jun y a la MAPK p38 (Williams et al. 1999). En fibroblastos murinos NIH 3T3 transfectados, los receptores α_{1a} y α_{1b} -adrenérgicos, pero no los α_{1d} , activan a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y a la p21^{ras}, ambas activadoras de la vía de MAPK (Hu et al., 1999).

Regulación de receptores α_1 -adrenérgicos

El receptor α_1 -adrenérgico que ha sido estudiado con mayor detalle es el α_{1b} . Leeb-Lundberg et al. (1987) demostraron que dicho receptor se fosforila por estímulo con su agonista. También asoció esta fosforilación con desensibilización y con la disminución del número de receptores en la membrana plasmática. Posteriormente Lattion et al. (1994), utilizando receptores truncados, demostraron que el carboxilo terminal es esencial para la fosforilación y desensibilización del

receptor. Los aminoácidos importantes en la desensibilización dependiente de fosforilación fueron mapeados por Diviani et al. (1997) en el carboxilo terminal, identificando a la Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰ como principales blancos de la acción de GRK.

La coexpresión de GRK2 o GRK3 y del receptor α_{1b} -adrenérgico incrementa la fosforilación y la desensibilización dependiente del agonista. La coexpresión del receptor con una dominante negativa de la GRK2 disminuye esta fosforilación (Diviani et al. 1996), estos datos indicarían que la cinasa implicada en la regulación del receptor α_{1b} -adrenérgicos es la GRK 2, sin embargo, la expresión de esta cinasa en células FRTL-5 no conduce a un aumento en la desensibilización del receptor α_{1b} (Iacovelli et al., 1999). Más recientemente utilizando ratones híbridos de líneas transgénicas, donde una de las líneas parentales sobreexpresa al receptor α_{1b} y la otra a una GRK (2, 3 ó 5), fue posible demostrar que la principal cinasa implicada en la regulación de este receptor es la GRK3, la GRK5 participa parcialmente y la GRK2 prácticamente no lo hace (Eckhard et al., 2000).

Experimentos de monitoreo óptico en tiempo real, realizados con células de ratón $\alpha T3$ donde el receptor α_{1b} -adrenérgico fue fusionado a la proteína verde fluorescente, mostraron que este receptor se internaliza de manera dependiente del agonista. Este proceso toma sólo unos minutos a partir de que se da el estímulo (Awaji et al., 1998). Trabajos anteriores habían presentado datos similares. En células HEK 293 de hígado embrionario de humano, se había observado una internalización rápida utilizando microscopía confocal de inmunofluorescencia (Fonseca et al., 1995). Sin embargo, otros estudios habían descrito una internalización lenta y en baja proporción (Lattion et al., 1994; Vázquez-Prado et al., 1997); quizá estas diferencias se deban al tipo celular utilizado.

En el proceso de desensibilización del receptor α_{1b} se ha demostrado la participación de proteínas arrestinas, así, la expresión de una arrestina mutante dominante negativa inhibe la internalización del receptor (Mhaouty-Kodja et al.,

1999). Por otra parte la expresión de arrestinas exógenas disminuye la formación de segundos mensajeros dependiente de la activación del receptor (Diviani et al., 1996). Todos los datos indican que el receptor experimenta desensibilización homóloga dependiente de su agonista y que se internaliza por una vía dependiente de arrestinas.

El receptor α_{1b} -adrenérgico también es sujeto de regulación heteróloga dependiente de PKC. Se ha demostrado ampliamente que los ésteres de forbol bloquean las acciones α_1 -adrenérgicas por activación de la PKC (Corvera & García-Sáinz, 1984). Posteriormente se ha descrito que los receptores α_{1b} son fosforilados por PKC, y que esto tiene una repercusión funcional (Lattion et al., 1994). Los aminoácidos blanco para PKC fueron mapeados por Diviani et al. (1997), y son la Ser³⁹⁴ y Ser⁴⁰⁰. En nuestro laboratorio se ha demostrado recientemente que el receptor α_{1b} humano también es fosforilado y regulado por acción de PKC (García-Sáinz et al., 1999)

La regulación de receptores por PKC tiene implicaciones importantes, una de ellas es el *cross talk*. Los receptores α_1 pueden ser regulados por la activación de otros receptores acoplados a $G_{\alpha q}$ y a $G_{\alpha i}$. Así, en células Rat-1 la activación de los receptores ET_A para endotelina induce la fosforilación del receptor α_{1b} , esta fosforilación lleva a la desensibilización del receptor. Se ha demostrado que esta regulación involucra a la PKC, pues se inhibe parcialmente por estaurosporina ; pero además, se requiere de una tirosina cinasa actuando en paralelo, sin embargo esta cinasa no ha sido identificada (Vázquez-Prado et al., 1997) .

La activación de receptores para ácido lisofosfatídico (LPA) inducen fosforilación y desensibilización del receptor α_{1b} , esta fosforilación es sensible a toxina pertusis lo que sugiere que depende de Gi. El estudio de la vía que regula esta fosforilación implica a la PKC y a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) actuando de manera secuencial (Casas-González et al., 2000). Además hay evidencias de que la activación de receptores con actividad de tirosina cinasa (para EGF y PDGF) inducen la fosforilación del receptor α_{1b} (Medina & García-Sáinz, datos en prensa).

Antecedentes

Como se ha discutido antes, la fosforilación es un proceso muy importante para la regulación funcional de los receptores acoplados a proteínas G. El estudio de los tres subtipos de receptores β -adrenérgicos ha revelado que su regulación por fosforilación es muy divergente entre receptores de una misma subfamilia. Así, la desensibilización inducida por activación de PKA es muy pronunciada para el β_2 , mucho menor para el β_1 , y no afecta la actividad del β_3 (Nantel et al., 1993). Esto pone de manifiesto la necesidad de estudiar cada subtipo de receptores de manera particular, tomando en cuenta que en varios tejidos estos receptores presentan coexpresión. Se ha demostrado la fosforilación de los receptores α_{1b} (Leeb-lunberg, 1987) y α_{1a} adrenérgicos (Vázquez-Prado, 2000. Para el α_{1b} se ha estudiado con detalle sus implicaciones funcionales. Sobre fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico y sus implicaciones no existen reportes.

En trabajos de nuestro laboratorio se han encontrado diferencias funcionales entre los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos. Se ha demostrado que los subtipos de receptores tienen diferente sensibilidad a la activación farmacológica de la PKC por TPA. Células transfectadas con un subtipo a la vez, preincubadas con TPA responden de manera diferente al estímulo con NE en la liberación de calcio intracelular y en la producción de IP_3 . El análisis de la estructura primaria de estos receptores indica que posiblemente existen diferencias en el grado de fosforilación entre los tres subtipos, pues el receptor α_{1a} que es insensible a TPA posee sólo tres sitios consensode fosforilación, el α_{1b} que es medianamente sensible presenta cuatro sitios y el subtipo α_{1d} , que es el más sensible a TPA, posee seis sitios de fosforilación potencial por PKC (Vázquez - Prado *et al.* 1996).

El receptor α_{1d} -adrenérgico posee una actividad independiente de ligando elevada, varios fármacos son capaces de actuar como agonistas inversos

disminuyendo su actividad basal en la liberación de calcio intracelular (García-Sainz & Torres-Padilla, 1999). Estos datos han sido apoyados por trabajos recientes donde se demuestra que el receptor α_{1d} está activado de manera constitutiva y está parcialmente internalizado (McCune et al., 2000). Es posible que la actividad de este receptor y su localización subcelular estén reguladas por un mecanismo dependiente de fosforilación.

Hipótesis

Las acciones α_{1d} -adrenérgicas son bloqueadas al estimular a la PKC con ésteres de forbol, es por ello que suponemos que el receptor α_{1d} es sujeto de fosforilación y que ello conduce a su modulación funcional.

Objetivos

General :

Conocer el papel de la fosforilación en la regulación de la actividad de los receptores α_{1d} adrenérgicos.

Particulares

1. Generar una metodología que permita el aislamiento del receptor α_{1d} -adrenérgico con el fin de poder estudiarlo.
2. Estudiar si el receptor α_{1d} -adrenérgico se fosforila al ser activado por su agonista natural.
3. Estudiar si el receptor α_{1d} -adrenérgico se fosforila de manera heteróloga
4. Establecer si la fosforilación de lo receptor α_{1d} -adrenérgico esta relacionada con la desensibilización.

Planteamiento experimental

El interés fundamental de este trabajo es explorar la relación entre la función del receptor α_{1d} -adrenérgico y su fosforilación. De manera general, la estrategia planteada fue la siguiente :

1.- Estudio de la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico

Para demostrar que el receptor se desensibiliza de manera homóloga y heteróloga, como había sido evidenciado por trabajos anteriores de nuestro laboratorio, se estudió el efecto de la preincubación de células que expresan el receptor α_{1d} -adrenérgico, con norepinefrina o con TPA, sobre la liberación de calcio intracelular inducida por norepinefrina .

Con el fin de explorar el desacoplamiento entre receptor y la proteína G, medimos el pegado de GTP γ S a la subunidad alfa de las proteínas G inducido por NE, después de preincubar las células con NE o TPA. Cuando un receptor es estimulado se produce el recambio de GDP por GTP en la subunidad alfa de la proteína G asociada. Si esto se hace *in vitro*, en presencia de un análogo no hidrolizable y radiomarcado del GTP ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$), podemos medir la eficiencia del acoplamiento receptor - proteína G.

2.- Generación de anticuerpos contra el receptor α_{1d} -adrenérgico.

El paso limitante para realizar los estudios de fosforilación era generar un anticuerpo específico con el cual se pudiese inmunoprecipitar al receptor. Se generó un anticuerpo policlonal en conejos, contra una proteína de fusión que contenía una glutatión-S-transferasa modificada, fusionada en su extremo carboxilo con un fragmento del carboxilo intracelular del receptor.

3.- Estudio de la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico.

Con el fin de saber si el proceso de desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico involucra la fosforilación del receptor, caracterizamos la fosforilación dosis-dependiente inducida por NE o TPA, así como su curso temporal. Así mismo, observamos el efecto de inhibidores específicos de la PKC y de la PI3K sobre la fosforilación del receptor. De la misma forma observamos el efecto de inhibidores específicos de la PKC y de la PI3K sobre la fosforilación cruzada del receptor. Caracterizamos la fosforilación inducida por la estimulación de otros receptores (regulación cruzada o *crosstalk*).

Materiales y métodos

Materiales y reactivos

Los fármacos (-)- Norepinefrina, ácido lisofosfatídico, endotelina I, bradicinina, TPA, estaurosporina, wortmanina, GTP γ S, GDP e inhibidores de proteasas fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. De Calbiochem fueron el RO 31-8220 y la bisindolilmaleimida I. El medio de cultivo DMEM, el suero fetal bovino, la tripsina, los antibióticos y otros reactivos usados en el cultivo celular fueron de Gibco BRL. Los compuestos radiomarcados [3 H]Prazosina (74.4 Ci/mmol), [25 I]arilazidoprazosina (2200 Ci /mmol), [35 S] GTP γ S (1250 Ci/mmol), y el [32 P]Pi (8500-9120 Ci/mmol) fueron de New England Nuclear. La proteína A acoplada a sefarosa fue de Upsdate Biotechnology. Fura-2/AM de Molecular Probes. Los kits de purificación de DNA fueron de Qiagen. Las enzimas de restricción y de modificación de Biolabs y Boheringer. Las membranas de PVDF de Amersham. La fentolamina fue generosamente donada por Ciba-Geigy. El IPTG fue de Sigma y la glutatión-sefarosa 4B de Pharmacia. La síntesis de oligonucleótidos y la secuenciación automática se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular de este Instituto.

Línea celular y cultivo

Se utilizaron fibroblastos de rata de la línea celular Rat-1 transfectados con el receptor α_{1a} adrenérgico de rata (Lomasney, 1991) los cuales expresan de manera estable al receptor; estas células fueron donadas generosamente por los doctores R.J. Lefkowitz, M.G. Caron y L. Allen de Duke University. La expresión de receptores ha sido corroborada por northern blot encontrando una señal positiva cuando se utiliza como sonda de hibridación un fragmento de 850 pares de bases

del receptor α_{1d} de rata. La densidad de receptores calculada por experimentos de unión de radioligandos fue 0.79 ± 0.11 pmol/mg de proteína (Vázquez-Prado, et al. 1996). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dubelco (DMEM) con alta glucosa y glutamina adicionado con 10% de suero fetal bovino, 300 μ g/ml del análogo de neomicina G-418 sulfato, 100 μ g/ml de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina y 0.25 μ g/ml de anfotericina B a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. En todos los experimentos las células se ayunaron en medio sin suero 24 horas antes del experimento.

Generación de anticuerpos contra el receptor α_{1d} -adrenérgico.

Con el fin de generar anticuerpos contra el receptor se decidió contruir una proteína de fusión para ser utilizada como inmunógeno. El dominio carboxilo terminal del receptor α_{1d} -adrenérgico de rata, se amplificó por PCR utilizando como templado el cDNA del receptor insertado en el plásmido pMT2 (Lomasney, 1991). El oligonucleótido sentido corresponde a las bases 1439 a 1459 del marco de lectura abierto del gen del receptor α_{1d} de rata y además contiene un sitio de restricción para la enzima BamHI : 5'-ATCTGCAGGGATCCCTCCGCCTCCGGGAGTGGAGA-3' y el antisentido corresponde a las bases 1663 a 1680 del gen con un sitio para EcoRI 5'-TACTGCAGGAATTCTCAAATGTCAGTCTCTCGGAG-3'. El fragmento amplificado de 243 pares de bases fue digerido con BamHI y EcoRI, purificado y ligado en el plásmido de expresión pGEX2T (Smith & Corcoran, 1994) previamente cortado con las mismas nucleasas. La construcción se analizó por patrón de restricción y por secuenciación automática. La proteína de fusión se expresó en *E. coli* de la cepa MGT-7, obteniéndose una proteína de ~ 29 KDa que fue posible purificar por afinidad con glutatión-sefarosa. Dado que la masa molecular esperada era de ~35.9 KDa se sospechó proteólisis. La proteína de fusión se secuenció parcialmente en el extremo amino terminal y se estableció que ese extremo estaba completo y por lo tanto que la proteólisis ocurría en el carboxilo; así, la proteína

de fusión contenía a la GST intacta y un péptido de ~2 KDa del receptor. La proteína de fusión se proteolizó con trombina (LaVallie, et al., 1997) y el péptido liberado fue purificado y secuenciado. La secuencia obtenida corresponde al receptor α_{1c} -adrenérgico (serina 480 a arginina 494). Con esta proteína se inmunizaron conejos para obtener los anticuerpos.

Inducción de la proteína de fusión

Las bacterias transformadas con el plásmido de la construcción se crecieron a 37°C con agitación constante, hasta 0.6 de absorbancia a 660 nm. La expresión de la proteína de fusión se indujo con 1 mM de isopropil-1-thio- β -D-galactopiranosido (IPTG) por 3 horas. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4000 RPM por 10 minutos a 4°C. La pastilla formada por las células se resuspendió en 1/10 del volumen original de PBS frío (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4.). Las bacterias se lisaron en un sonicador, en presencia de 20 mg/ml de DNasa I. A los sonicados se les adicionó 0.2 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 5 mM de EDTA y 1% de tritón X-100. El lisado se centrifugó 15 minutos a 13000 RPM y la fracción soluble se absorbió con glutatión-sefarosa. Las proteínas unidas a la glutatión-sefarosa se lavaron con PBS y se eluyeron con 10 mM de glutatión reducido en 50 mM de Tris-HCl pH 8.0. La pureza del eluido se verificó por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y los geles se tiñeron con azul de Coomassie. La concentración de las muestras fue medida por espectrofotometría con una lámpara de UV a 280 nm de longitud de onda.

Liberación de calcio intracelular

Células confluentes cultivadas en cajas petri de 10 cm fueron ayunadas desde una noche antes del experimento en DMEM sin suero, estas fueron cargadas con 5 μ M del fluoróforo Fura 2/AM a 37 °C por una hora en Krebs-Ringer-HEPES con 0.05%

de albúmina bovina del suero (BSA). En seguida se despegaron de la caja por la adición de tripsina y se lavaron 3 veces con Krebs-Ringer-HEPES-BSA. Los experimentos se realizaron con 10^6 células aproximadamente suspendidas en 3 ml del mismo buffer suplementado con 1.2 mM de CaCl_2 .

Obtención de membranas

Cajas de células confluentes se lavaron dos veces con buffer salino (PBS), e inmediatamente después se les adicionó 1 ml de solución de lisis (Tris 50 mM , NaCl 150 mM, EDTA 50 mM, p-serina 2 mM, p-tirosina 2 mM, p-treonina 2 mM, β -glicerafosfato 10 mM, pirofosfato de sodio 1 mM , Na_3VO_4 5 mM, y los inhibidores de proteasas usados en la inmunoprecipitación, pH 7.4). Las cajas de cultivo se mantuvieron con esta solución sobre hielo por una hora. A continuación las células se despegaron con un gendarme y se homogenizaron en un homogenizador de vidrio-teflón. La solución obtenida se centrifugó a $1500 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . El sobrenadante se volvió a centrifugar a $20000 \times g$ por 20 minutos a 4°C y finalmente la pastilla, que contenía las membranas, se resuspendió en solución amortiguadora de Tris- MgCl_2 (Tris 50 mM, MgCl_2 10 mM , pH 7.5). La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry.

Unión de [^{35}S]GTP γ S.

Cajas de células confluentes se trataron y estimularon con diferentes agentes de acuerdo al protocolo de cada experimento. Posteriormente se obtuvieron membranas de estas células de acuerdo al procedimientos descrito previamente. Las membranas se incubaron a 25°C en Tris- MgCl_2 con [^{35}S]GTP γ S 0.2 nM. La reacción se inició al agregar las membranas (25 μg de proteína) y se terminó por dilución en frío, filtración y lavado con solución de Tris- MgCl_2 a 4°C . Se utilizaron filtros Whatman GF/C y un multifiltrador Brandell. La unión no específica se

determinó en presencia de GTP γ S 30 mM no radiomarcado y representó menos del 10% de la unión total.

Marcaje de fotoafinidad

Membranas de células Rat-1 que expresan el receptor α_{1d} -adrenérgico (25 μ g de proteína en 100 μ l) se incubaron en la oscuridad y con agitación constante con 6 nM de [¹²⁵I]arilazidoprazosina en un buffer que contenía 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, más inhibidores de proteasas, pH 7.4. Después de una hora de incubación se adicionaron 700 μ l del mismo buffer y los tubos abiertos fueron expuestos a luz UV por 3 minutos (Stratalinker, Stratagene). Las membranas se centrifugaron a 13000 RPM por 15 minutos, se lavaron y se fraccionaron por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras. La especificidad del marcaje se determinó por competencia con 10 μ M de fentolamina.

Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se estandarizó por marcaje de fotoafinidad con [¹²⁵I]arilazidoprazosina en membranas de fibroblastos Rat-1 que expresan el receptor α_{1d} -adrenérgico. Se utilizó un antisuero de conejo contra la proteína de fusión GST- α_{1d} -AR previamente descrita. Las membranas marcadas con [¹²⁵I]arilazidoprazosina se solubilizaron en 500 μ l de buffer de lisis (50 mM tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1.5% tritón, 5 mM EDTA, 20 μ g/ml leupeptina, 20 μ g/ml aprotinina, 100 μ g/ml fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y 50 μ g/ml de inhibidor de tripsina de soya) durante 1 hora a 4°C. Los extractos se colectaron y centrifugaron a 13000 RPM por 15 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a tubos que contenían 10 ml de antisuero y 40 ml de proteína A-Sefarosa, estos se incubaron toda la noche a 4°C. Las camas de proteína A sefarosa se lavaron 5 veces con 1 ml de buffer de lavados (50 mM HEPES, 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM

NaCl, 1.5% tritón X-100, 0.1% SDS y mM NaF pH 7.2). Las camas lavadas se resuspendieron en 50 μ l de SDS al 10% y se agitaron en un vortex, entonces se adicionaron 50 μ l de buffer Laemmli 2X. A continuación se hirvieron por 10 minutos y se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles se secaron y se expusieron a filme X-OMAT (Eastman Kodak) a -80°C. El análisis de la inmunoprecipitación se realizó en un *Molecular Dynamics Phosphor Imager (Storm)*.

Fosforilación

Los cultivos de fibroblastos Rat-1 que expresan el receptor α_{1c} -adrenérgico, crecidos a confluencia se ayunaron en medio libre de suero por 24 horas. El día del experimento las células se incubaron 1h en DMEM sin fosfatos y posteriormente en 3 ml del mismo medio conteniendo [32 P]Pi (0.0166 mCi/ml) por 3 horas a 37 °C, las células marcadas se incubaron con fármacos o se estimularon con hormonas de acuerdo al protocolo de cada experimento y posteriormente se lavaron con buffer salino (PBS) frío y se solubilizaron en 500 μ l de buffer de lisis (50 mM tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1.5% tritón, 50 mM NaF, 100 μ M Na₃VO₄, 10 mM β -glicerofosfato, 10 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfoserina, 1 mM de fosfotreonina, 5 mM EDTA, 20 μ g/ml leupeptina, 20 μ g/ml aprotinina, 100 μ g/ml fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y 50 μ g/ml de inhibidor de tripsina de soya) por una hora sobre hielo. Los extractos se colectaron y centrifugaron a 13000 RPM por 15 minutos. De los sobrenadantes se inmunoprecipitó el receptor fosforilado como se describió antes. El receptor fosforilado fue detectado en un *Molecular Dynamics Phosphor Imager (Storm)* y la cuantificación se realizó con el software Imagequant del propio equipo.

Ensayos de inmunodetección (western blot)

Los inmunoprecipitados obtenidos como se describió atrás, se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Sigma) utilizando una cámara de transferencia semiseca. La membrana con las proteínas se bloqueó por 16 horas a 4°C con agitación constante en TBS-Tween-leche (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0.1% y leche sin grasas 5%). Después del bloqueo la membrana se lavó y luego se incubó por 90 minutos con el anticuerpo primario en concentración 1 : 5000 en TBS-Tween-leche. Luego de lavar completamente esta solución, se incubó por una hora con 1 :1000 del anticuerpo secundario. El revelado se realizó utilizando un sustrato de inmunofluorescencia de Pierce.

Resultados

A continuación se presentan los resultados correspondientes a la obtención del anticuerpo dirigido contra el receptor α_{1D} -adrenérgico. El resto de los resultados se presentan en un resumen, y se exponen de manera detallada en el manuscrito :

Phosphorylation and Desensitization of α_{1D} -Adrenergic Receptors. Autores : J. Adolfo García-Sáinz, Francisco G. Vázquez-Cuevas y María Teresa Romero-Avila. El manuscrito ha sido enviado para su publicación.

Generación de anticuerpos contra el receptor α_{1D} -adrenérgico

Para lograr la inmunoprecipitación del receptor fue necesario obtener un anticuerpo policlonal utilizando como antígeno una proteína de fusión con la proteína glutation-S-transferasa (GST) y el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -adrenérgico, como se detalla en materiales y métodos.

Se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de 243 pares de bases del carboxilo terminal del receptor, utilizando como templado el cDNA del receptor α_{1D} -adrenérgico de rata insertado en el plásmido pMT2 y los oligonucleótidos descritos en materiales y métodos. El fragmento fue cortado por las nucleasas BamHI y EcoRI y ligado en el plásmido pGEX2T (Pierce) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

Para confirmar la inserción se llevó a cabo el análisis del patrón de restricción. En la separación electroforética de la construcción digerida con BamHI y EcoRI (Fig. 6), se observan dos bandas, una pesada mayor a 3000 pb que corresponde al plásmido pGEX2T y una ligera que correlaciona con el tamaño del inserto (243 pb).

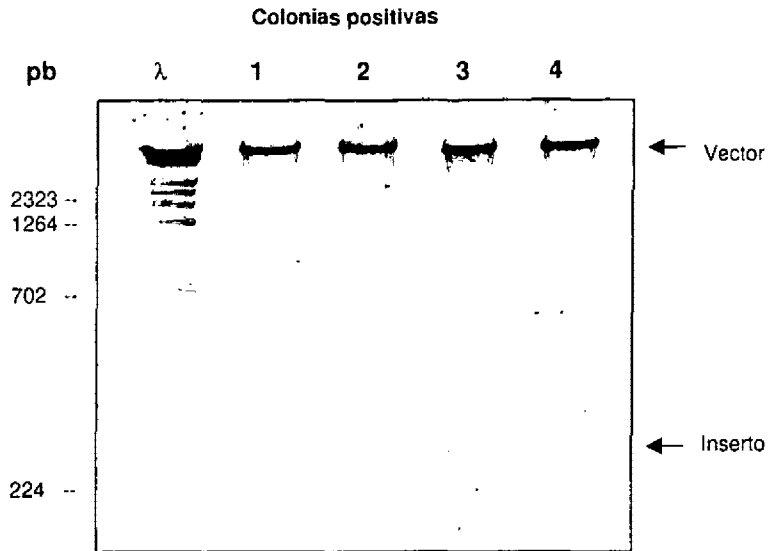


Fig 6. Patrón de restricción EcoRI-BamHI de la construcción GST- α_{1d} .

Para corroborar este resultado se llevó a cabo la secuenciación automática del plásmido. El análisis de la secuencia de la región localizada entre los sitios BamHI y EcoRI permitió identificar un codón no reportado en la literatura entre las bases 2018 y 2019, que codifica el aminoácido glicina entre los aminoácidos G-513 y A-514 de la secuencia reportada por Lomasney, et al., (1996). El resto de la secuencia alineó perfectamente con la del receptor y estuvo en marco de lectura correcto. Con estas evidencias se utilizó el plásmido para transformar bacterias *E. coli* de la cepa MGT-7 y expresar la proteína.

La masa molecular esperada de la proteína de fusión era de ~35.9 KDa. La inducción evidenció una banda del peso esperado, visible solamente en la fracción insoluble de los extractos bacterianos (Fig. 7). Sin embargo, en la fracción soluble la purificación por afinidad utilizando glutatión acoplado a sefarsa permitía identificar una banda única de ~29 KDa (Fig. 7), sólo 2 KDa mayor a la GST.

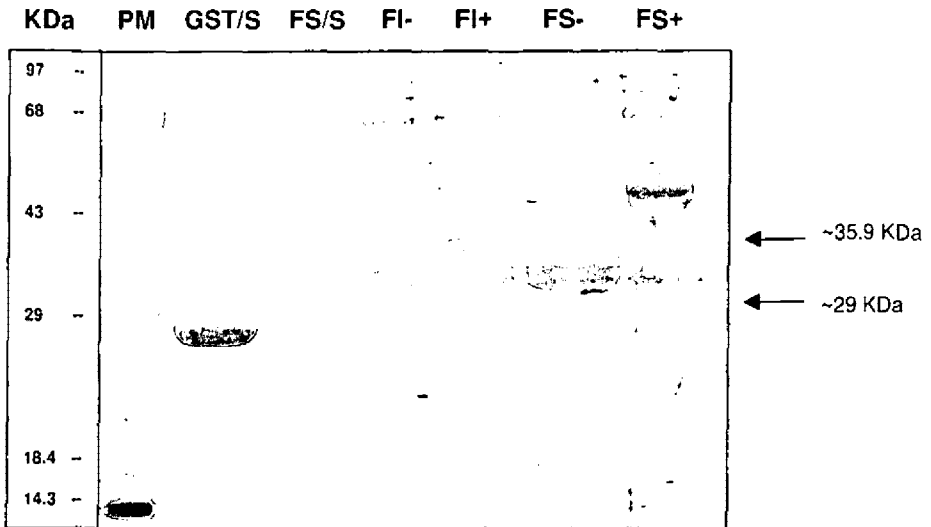


Fig. 7. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de extractos de bacterias transformadas con la construcción GST- α 1d, inducidas con IPTG. (PM, pesos moleculares; GST/S, GST purificada con glutation-sefarosa; FS/S, fracción soluble absorbida con glutation-sefarosa; FI-, fracción insoluble sin inducir; FI+, fracción insoluble inducida; FS-, fracción soluble sin inducir; FS+, fracción soluble inducida).

El análisis tipo western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la GST permitió identificar claramente ambas bandas (Fig. 8). La banda mayoritaria era la de ~29 KDa.

Estos resultados sugerían que la proteína de fusión sufría proteólisis en alguna etapa de la inducción. Para enfrentar este problema se transformó otras razas de *E. coli*, que fueron JM103, Y1090, Y1089 y XL1-Blue, pero no se observaron cambios (datos no mostrados). También se realizó la inducción de la proteína a 30 °C observándose los mismos resultados. El hecho de que la banda de ~29 KDa podía purificarse fácilmente y en abundancia (1 mg/100 ml de cultivo), en contraste con la banda de 35.9 KDa, nos llevó a caracterizarla.

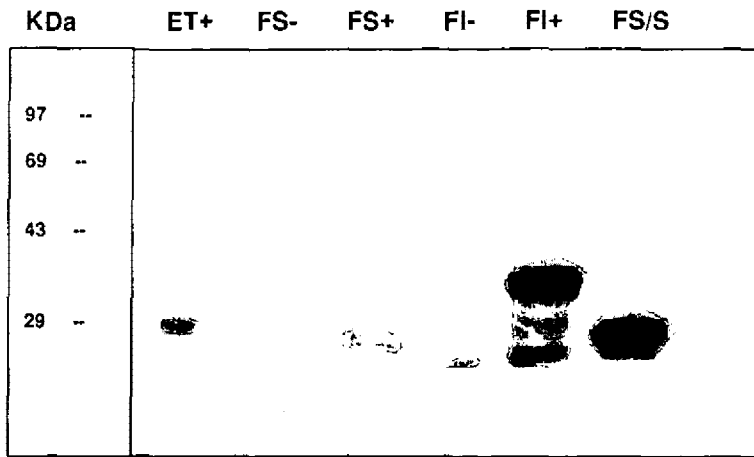


Fig. 8. Western blot de extractos de bacterias transformadas con la construcción GST- α_{1d} , inducidas y sin inducir con IPTG. Se utilizó un anticuerpo dirigido contra la GST (ET+, extracto total inducido; FS-, fracción soluble sin inducir; FS+, fracción soluble inducidas; FI-, fracción insoluble sin inducir; FI+, fracción insoluble inducida; FS/S fracción soluble absorbida con glutatión-sefarosa).

El extremo amino terminal de la proteína de ~29 KDa fue secuenciado, la secuencia mostró que la GST estaba íntegra y se demostró que esta proteína era producto de la proteólisis del extremo carboxilo de la proteína de ~35.9 KDa. Dado que la GST tienen una masa molecular de 27 KDa calculamos que el fragmento del receptor que se mantenía unido a la GST era de ~2 KDa.

Para conocer la secuencia de aminoácidos del péptido de 2 KDa fusionado a la GST, se decidió escindirlo utilizando un sitio de trombina presente en el vector, el corte fue muy eficiente y permitió la purificación del péptido (Fig. 9).

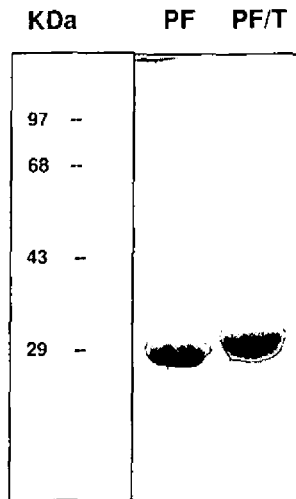


Fig 9. SDS-PAGE de la proteína de fusión completa (PF) y después del corte del péptido correspondiente al receptor α_{1d} -adrenérgico (PF/T). El corte se realizó con la proteasa trombina.

El péptido purificado fue secuenciado. La secuencia obtenida fue :G (correspondiente a la GST)-SLRLREWRLGPLQR (ser 480 a Arg 495 del receptor α_{1d} -adrenérgico). Esto confirmó que la proteína de ~29 KDa efectivamente lleva un fragmento del receptor α_{1d} -adrenérgico, por lo tanto esta proteína de fusión fue utilizada para inmunizar conejos y obtener el anticuerpo.

Resumen del trabajo: "Phosphorylation and desensitization of α_{1d} -adrenergic receptors"

Liberación de calcio intracelular

La concentración basal de calcio en el citosol de fibroblastos Rat-1 que expresan de manera estable al receptor α_{1d} -adrenérgico fue de 162 ± 18 nM (n=16), el estímulo con $10 \mu\text{M}$ de NE induce un incremento inmediato en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta 600-700 nM. Este efecto de NE tuvo un comportamiento dosis dependiente con una EC_{50} de 95 ± 10 nM (n=4). Cuando las células son preincubadas con la catecolamina y posteriormente se estimula con la misma hormona la respuesta de calcio ya no se presenta, lo cual sugiere que el receptor sufre desensibilización homóloga. Cuando las células son estimuladas con TPA se presenta una disminución en la concentración basal de calcio intracelular, lo que se ha atribuido a una disminución en la actividad intrínseca (independiente de ligando). Cuando se dan de manera sucesiva el estímulo con TPA y posteriormente con NE, el efecto de la NE en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es bloqueado, lo que sugiere que el receptor sufre desensibilización heteróloga (Fig. 1 del manuscrito).

Unión de $\text{GTP}\gamma\text{S}$

Con el fin de determinar si el efecto de NE o TPA sobre la capacidad de respuesta del receptor afecta la interacción receptor-proteína G, se midió la unión inducida por NE de un análogo no hidrolizable de GTP ($[\text{35S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$) en membranas de células control y pretratadas con NE ó TPA por 5 minutos. Tanto el pretratamiento con NE como el pretratamiento con TPA disminuyen significativamente el pegado de $[\text{35S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ inducido por norepinefrina (Fig.2 del manuscrito). Esto indica que NE y TPA inducen un desacoplamiento del receptor de su proteína G.

Marcaje de fotoafinidad e inmunoprecipitación

El fotomarcaje del receptor y con [¹²⁵I]arilazidoprazosina se realizó en membranas de células rat-1 que expresan al receptor α_{1d} -adrenérgico. El marcaje de fotoafinidad resultó en la aparición de tres bandas específicas del receptor. La banda mayoritaria migra entre 75 y 85 KDa y corresponde al receptor completo, y la de ~43 KDa probablemente a un fragmento de proteólisis. La banda más pesada es >150 KDa y puede corresponder a receptores dimerizados o agregados con otras proteínas (Fig. 3 del manuscrito). Nuestros datos correlacionan con los obtenidos por Schwinn & Kwata, 1998, en el fotomarcaje de receptor α_{1d} -adrenérgico humano.

La inmunoprecipitación resultó altamente eficiente utilizando el antisuero generado con la proteína de fusión descrita atrás. Las tres bandas específicas que se observaron en el marcaje de fotoafinidad fueron inmunoprecipitadas con al menos 80 % de rendimiento. El suero preinmune no inmunoprecipitó ninguna proteína

La especificidad de la inmunoprecipitación se corroboró por western blot con un anticuerpo comercial dirigido contra el decapeptido terminal del receptor α_{1d} -adrenérgico (Santa Cruz Biotech), las bandas positivas a la inmunodetección son idénticas a las obtenidas usando nuestro anticuerpo (Fig. 10), y corresponden a las observadas en el marcaje de fotoafinidad. Además la inmunoprecipitación de la banda mayoritaria del receptor de ~70 KDa es bloqueada por competencia con el péptido escindido de la proteína de fusión (Fig. 10).

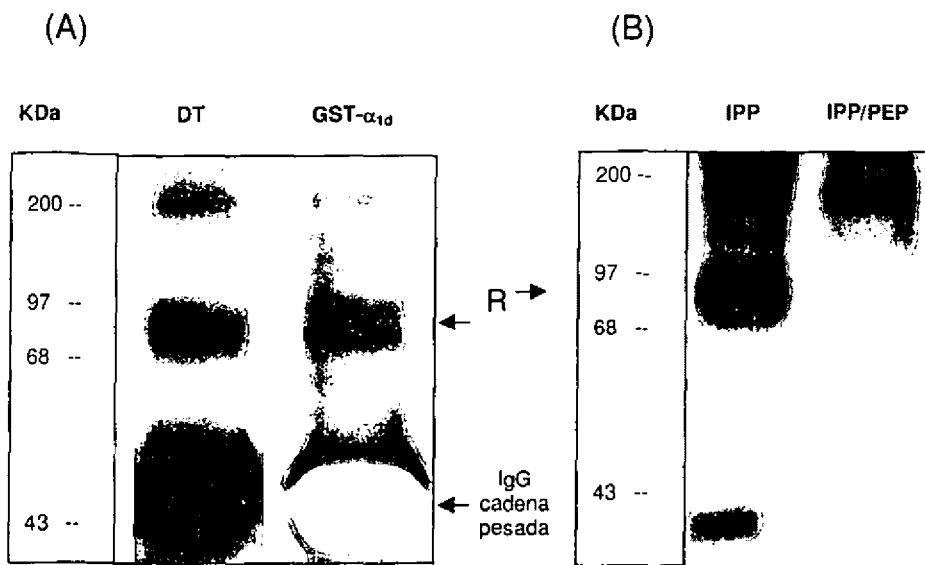


Fig. 10. A. Western blot de los inmunoprecipitados obtenidos, utilizando el anticuerpo generado con la proteína de fusión (GST- α_{1d}), o un anticuerpo comercial dirigido contra el decapeptido terminal del receptor (DT). B. Inmunoprecipitación del receptor α_{1d} -adrenérgico (IPP) y competencia con el péptido escindido de la proteína de fusión GST- α_{1d} (IPP/PEP). Receptor (R).

Estudio de la fosforilación del receptor

Con la inmunoprecipitación del receptor lista se realizaron los experimentos de fosforilación. El receptor se encuentra fosforilado en situación basal y esta fosforilación incrementa de 2 a 3 veces por la acción de su agonista (NE) y por activación farmacológica de la proteína cinasa C (PKC) por TPA (NE 10 μ M, 205 \pm 13 %, n=11 y TPA 1 μ M, 269 \pm 20%, n=10). Los estudios de dosis-respuesta a norepinefrina y TPA mostraron un comportamiento dosis dependiente. La EC_{50} para NE fue de \sim 75 nM y para TPA de \sim 25 nM (Fig. 5 del manuscrito). Los cursos temporales muestran que la fosforilación inducida por NE es rápida alcanza el máximo al minuto y se mantiene por 5 minutos ; para posteriormente caer paulatinamente y regresar al valor basal a los 60 minutos. Por el contrario el TPA induce una fosforilación un poco más lenta alcanzando el máximo a los 5

minutos y manteniéndose por 60 minutos (Fig. 6 del manuscrito). Estos resultados son coherentes con la acción rápida de un agonista en la fosforilación del receptor así como con la acción lenta de la PKC cuando esta es activada por TPA.

Experimentos utilizando inhibidores de la PKC y de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) mostraron que la fosforilación inducida por norepinefrina no es sensible a la inhibición de dichas cinasa. Por el contrario, el efecto de TPA fue bloqueado por inhibidores de la proteína cinasa C : estaurosporina 300 nM, Ro 31-8220 300 nM ó bisindolilmaleimida 1 μ M ; pero no fue sensible a la inhibición de la PI3K por 100 nM wortmanina (Fig. 7 del manuscrito).

Finalmente se demostró que el receptor α_{1d} experimenta regulación cruzada. La estimulación de los receptores a endotelina, ácido lisofosfatídico y bradicinina, expresados endógenamente en esta línea celular, fueron capaces de inducir la fosforilación del receptor (Fig. 8 del manuscrito). Por lo menos en el caso de LPA esta fosforilación tiene una repercusión funcional e induce a desensibilización como lo muestra la disminución en la efectividad de unión de [35 S]GTP γ S (Fig. 2 del manuscrito).

Phosphorylation and Desensitization of α_{1d} -Adrenergic Receptors

J. Adolfo García-Sáinz, Francisco G. Vázquez-Cuevas and María Teresa Romero-Ávila

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 70-248; México D. F. 04510

Running title: α_{1d} -Adrenoceptor phosphorylation

Corresponding author: J. Adolfo García-Sáinz, MD PhD
Inst. Fisiología Celular, UNAM;
Ap. Postal 70-248; México D. F. 04510.
Tel.: (525) 622 5673
Fax: (525) 622 5613
E-mal: agarcia@ifisiol.unam.mx

| | |
|--------------------------------------|------|
| Number of Text pages: | 39 |
| Number of Tables: | 0 |
| Number of Figures: | 8 |
| Number of References: | 37 |
| Number of Words in the Abstract: | 187 |
| Number of Words in the Introduction: | 538 |
| Number of Words in the Discussion: | 1291 |

List of nonstandard abbreviations: AR, adrenergic receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GRK, G protein-coupled receptor kinase; PKC, protein kinase C; NE, norepinephrine; TPA, tetradecanoyl phorbol acetate; GST, glutathione-S-transferase.

ABSTRACT

In rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1d} -adrenoceptors, norepinephrine and phorbol myristate acetate markedly decreased α_{1d} -adrenoceptor function (norepinephrine-elicited increases in calcium in whole cells and [35 S]GTP γ S binding in membranes) suggesting homologous and heterologous desensitizations.

Photoaffinity labeling, Western blot and immunoprecipitation identified α_{1d} -adrenoceptors as a broad band of Mr 70-80 kDa. α_{1d} -Adrenoceptors were phosphorylated in the basal state and norepinephrine and phorbol myristate acetate increased it. The effect of norepinephrine was concentration dependent (EC_{50} 75 nM), rapid (maximum at 1 min) and transient. Phorbol ester-induced phosphorylation was concentration-dependent (EC_{50} 25 nM) slightly slower (maximum at 5 min) and stable for at least 60 min. Inhibitors of protein kinase C decreased the effect of phorbol esters but not that of norepinephrine. Crosstalk of α_{1d} -adrenoceptors with receptors endogenously expressed in rat-1 fibroblasts was evidenced by the ability of endothelin, lysophosphatidic acid and bradykinin to induce α_{1d} -adrenoceptor phosphorylation.

In summary, it is first shown here that α_{1d} -adrenoceptors are phosphoproteins and that receptor phosphorylation is increased by the natural ligand, norepinephrine, by direct activation of protein kinase C and via crosstalk with other receptors endogenously expressed in rat-1 fibroblasts; receptor phosphorylation has functional repercussion.

INTRODUCTION

The actions of the natural adrenergic amines, epinephrine and norepinephrine (NE), are mediated through G protein-coupled receptors. The function of these receptors, as that of many other receptor of this type, is tightly regulated and phosphorylation seems to be one of the major molecular mechanisms through which this regulation is accomplished (Ferguson *et al.*, 1997; Krupnick and Benovic, 1998; Pitcher *et al.*, 1998; García-Sáinz *et al.*, 2000). The phosphorylation state of these receptors seems to modulate receptor sensitivity and therefore, cellular responsiveness. Phosphorylation is considered the initial step in the process of desensitization. Current evidence indicates that in homologous desensitization, agonists-activated receptors interact with G proteins, which leads to guanine nucleotide exchange and to the release of G $\beta\gamma$ complexes. Such complexes recruit soluble GRKs, which catalyze receptor phosphorylation. β -Arrestins bind phosphorylated receptors, stabilizing an uncoupled state of the receptors and act as bridges that bind clathrin molecules that initiate receptor internalization (Ferguson *et al.*, 1997; Krupnick and Benovic, 1998; Pitcher *et al.*, 1998; García-Sáinz *et al.*, 2000). Second messenger-activated protein kinases, such as protein kinase A and PKC also promote receptor phosphorylation, eliciting heterologous desensitization (Ferguson *et al.*, 1997; Krupnick and Benovic, 1998; Pitcher *et al.*, 1998; García-Sáinz *et al.*, 2000).

Three families of adrenergic receptors exist: the α_1 -, α_2 - and β -ARs and three receptor subtypes of each family have been cloned (Hieble *et al.*, 1995). Within a family of receptors there are differences in regulation, which are frequently associated to susceptibility of the various receptors to be phosphorylated. It is known that subtypes of the α_2 - and β -ARs are subjected to desensitization according to their suitability as kinase

substrates (Liggett *et al.*, 1993; Kurose and Lefkowitz, 1994). The information on α_1 -ARs is still very incomplete (reviewed in García-Sáinz *et al.*, 2000).

Three α_1 -ARs have been cloned, i. e., the α_{1a} , α_{1b} and α_{1d} subtypes (Cotecchia *et al.*, 1988; Schwinn *et al.*, 1990; Lomasney *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991). There is evidence that these isoforms are differentially regulated by activation of PKC (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996). Thus, activation of PKC with TPA markedly inhibits the actions mediated through the α_{1b} and α_{1d} subtypes whereas those mediated through α_{1a} -ARs are only marginally altered (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996; Vázquez-Prado *et al.*, 2000). α_{1b} -AR phosphorylation has been extensively studied and a major role of PKC in heterologous desensitization is well documented (Leeb-Lundberg *et al.*, 1985; Lattion *et al.*, 1994; Diviani *et al.*, 1996; Vázquez-Prado *et al.*, 1996; Vázquez-Prado *et al.*, 1997; García-Sáinz *et al.*, 2000; Vázquez-Prado *et al.*, 2000). It was very recently shown that α_{1a} -ARs are also subject of phosphorylation, although to a much lesser extent than α_{1b} -ARs, and that such phosphorylation has only a minor functional repercussion (Vázquez-Prado *et al.*, 2000). No data have been published yet on α_{1d} -AR phosphorylation.

In the present manuscript we show that α_{1d} -ARs, stably expressed in rat-1 fibroblasts, are phosphorylated in the basal state and that such phosphorylation is increased in response to NE and TPA. These receptor phosphorylations are associated to desensitization evidenced both in whole cells and in membrane preparations. In addition, we showed that there is crosstalk with other receptors endogenously expressed in rat-1 fibroblasts, i. e., activation of the receptors for endothelin, bradykinin and lysophosphatidic acid induce α_{1d} -AR phosphorylation.

MATERIALS AND METHODS.

Materials. (-)-Norepinephrine, lysophosphatidic acid, endothelin I, bradykinin, TPA, staurosporine, wortmannin, GTP γ S, GDP and protease inhibitors were obtained from Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO). Ro 31-8220 and bisindolylmaleimide I were from Calbiochem (San Diego, CA). Phentolamine was a generous gift from Ciba-Geigy (Summit, NJ). DMEM, fetal bovine serum, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD). [3 H]Prazosin (74.4 Ci/mmol), [125 I]arylazidoprazosin (2200 Ci/mmol), [35 S]GTP γ S (1250 Ci/mmol), [32 P]Pi (8500-9120 Ci/mmol) and labeled nucleotides were from New England Nuclear (Boston, MA). Sepharose-coupled protein A was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Fura-2/AM was from Molecular Probes (Eugene, OR). DNA purification kits were from Qiagen (Valencia, CA). Restriction and modification enzymes were from New England Biolabs (Beverly, MA) and Boehringer (Mannheim, Germany). Nylon membranes were from Amersham (Buckinghamshire, England). Oligonucleotides and automatic sequencing were done in the Molecular Biology Unit of our Institute. A commercial antibody against α_{1d} -ARs obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) was used where indicated.

Cell line and culture. Rat-1 fibroblasts transfected with the rat α_{1d} -AR (Lomasney *et al.*, 1991), generously provided to us by Drs. R. J. Lefkowitz, M.G. Caron and L. Allen (Duke University), were cultured in glutamine-containing high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 300 μ g/ml of the neomycin analog, G-418 sulfate, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin and 0.25 μ g/ml amphotericin B at 37 °C under a 95 % air/5 % CO $_2$ atmosphere as described previously (Vázquez-Prado

and García-Sáinz, 1996). The α_{1d} -AR density in these cells was in the range of 0.6-1 pmol/mg membrane protein with a K_D for [3 H]prazosin of 0.20-0.30 nM in agreement with previous reports (Vázquez-Prado *et al.*, 1996). For all the experiments, confluent cells were serum-deprived overnight in unsupplemented DMEM. Non transfected wild type rat-1 fibroblasts were cultured under the conditions described above but in the absence of G-418; as anticipated, no α_1 -ARs were detected in [3 H]prazosin binding studies and no functional response to NE was detected (data not shown).

[Ca²⁺]_i measurements. Confluent fibroblasts were incubated overnight in DMEM without serum and antibiotics. Cells were loaded with 5 μ M Fura-2/AM in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4 for 1 h at 37 °C. Cells were detached by gentle trypsinization. Experiments were performed with about 10⁶ cells suspended in 3 ml of the above-mentioned buffer supplemented with 1.2 mM CaCl₂. Fluorescence measurements were carried out, as described previously (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 2000) with an Aminco-Bowman (Urbana, IL) Series 2 Spectrometer with excitation monochromator set at 340 and 380 nm, with a chopper interval 0.5 sec, and the emission monochromator set at 510 nm. [Ca²⁺]_i was calculated according to Grynkiewicz *et al.* (1985) using the software provided by Aminco-Bowman; traces were directly exported to the graphs.

Membrane preparation and [³⁵S]GTP γ S binding. Cells were treated with the different agents to be tested. After stimulation, cells were washed and scraped with a rubber policeman in buffer containing: 20 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM MgCl₂, and protease inhibitors (leupeptin 20 μ g/ml, aprotinin 20 μ g/ml, PMSF 100 μ g/ml, bacitracin 500

$\mu\text{g/ml}$ and soybean trypsin inhibitor $50 \mu\text{g/ml}$). Membranes were prepared as described (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 2000) and resuspended in binding buffer (50 mM Tris, 0.10 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, pH 7.4 containing 0.1% bovine serum albumin, 1 mM DTT and $1 \mu\text{M}$ GDP. [^{35}S]GTP γS binding was performed as described by Wieland and Jakobs (1994) with minor modifications. The binding reaction was carried out in a volume $250 \mu\text{l}$ for 30 min at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ in binding buffer containing 0.2 nM [^{35}S]GTP γS . The reaction was initiated by the addition of membranes ($25 \mu\text{g}$ protein/tube) and terminated by the addition of 2 ml of ice-cold 50 mM Tris, pH 7.4, containing 10 mM MgCl_2 and filtration on Whatman GF/C filters. Filters were washed three times and dried; radioactivity was measured with a Beckman LS 6000 SC liquid scintillation counter. Nonspecific binding was determined in the presence of $30 \mu\text{M}$ cold GTP γS and represented about 10% of total binding. Statistical analysis between comparable groups was performed using ANOVA with Newman-Keuls analysis with the software included in the GraphPad Prism 3 program (GraphPad Software; San Diego, CA).

Photoaffinity labeling of the α_{1d} -ARs. Membranes from Rat-1 cells expressing rat α_{1d} -AR were obtained as previously described (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 2000). In the dark, membranes ($25 \mu\text{g}$ protein) were incubated with 6 nM of [^{125}I]arylazidoprazosin essentially as described (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 2000). After 1 h at room temperature, 1 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and the previously mentioned protease inhibitors was added. Open tubes were exposed to UV light for 3 min . Membranes were centrifuged at $12,700 \times g$ for 15 min , washed and subjected to 10% SDS-PAGE under

reducing conditions. Specificity of the labeling was determined using 10 μ M phentolamine as a competitor.

Construction of a GST- α_{1d} -AR fusion protein. The carboxyl-terminal domain of the rat α_{1d} -AR was amplified by PCR using plasmid pMT2 containing the rat α_{1d} -AR cDNA (Perez *et al.*, 1991) (generously donated by Dr. R. M. Graham, V. Chang Cardiac Research Unit, Sidney, Australia). The oligonucleotides: 5'-ATCTGCAGGGATCCCTCCGCCTCCGGGAGTGGAGA-3' (sense) corresponding to bases 1439 to 1459 of the rat α_{1d} open reading frame (Lomasney *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991), with an additional BamHI site, and 5'-TACTGCAGGAATTCTCAAATGTCAGTCTCTCGGAG-3' (antisense), corresponding to bases 1663 to 1680 of the gene (Lomasney *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1999) with an EcoRI site were used. The amplified fragment (243 bp) was digested with BamHI-EcoRI and ligated with pGEX2T also digested with the same enzymes. The construction was analyzed by restriction analysis and automatic sequencing. The fusion protein was expressed in *E. coli* (strain MGT-7) under induction conditions and a protein of Mr ~ 29 kDa was expressed and affinity-purified with glutathion-sepharose. The anticipated Mr of the fusion protein was 35.9 kDa, which lead us to suspect that proteolysis was taking place. The fusion protein was partially sequenced (amino terminal) and it was intact indicating that proteolysis took place at the carboxyl terminus. Therefore, the fusion protein contained a non-proteolyzed GST fused to a receptor peptide of the rat α_{1d} -AR sequence (Lomasney *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991). The fusion protein was proteolyzed with thrombin (LaVallie *et al.*, 1997) and the released peptide purified and sequenced: (G (corresponding to GST)-SLRLREWRLGPLQR (receptor fragment)).

Immunoprecipitation of α_{1d} -ARs. Photoaffinity labeled membranes expressing α_{1d} -ARs were used to standardize immunoprecipitation of the receptor. The procedure was similar to that used for the other subtypes (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 2000). Rabbit antiserum, against the described GST- α_{1d} -AR fusion protein was used. Membranes were solubilized in 0.5 ml of solubilization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1.5 % Triton X-100, 0.1 % SDS, and the previously mentioned protease inhibitors). After 1 h at 4°C, the extracts were centrifuged at 12,700 g for 15 min at 4°C and the supernatants were transferred to new tubes containing 10 μ l of immune serum. Tubes were incubated overnight at 4°C. Then, 40 μ l of sepharose-coupled protein A, 50% (v/v) slurry, were added and incubated for 1-2 h. Beads were washed five times (1 ml/each) with 50mM Hepes, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.2, containing 1 % Triton X-100, 0.25 % SDS and 100 mM NaF. Washed beads were suspended in 50 μ l of 10 % SDS and vortexed, then 50 μ l of 2X Laemmli sample buffer containing 5 % 2-mercapto-ethanol were added. Samples were incubated during 5 min in a boiling bath and electrophoresed in 10 % SDS-PAGE minigels. Gels were fixed, dried and exposed to X-OMAT X Ray-film (Eastman Kodak Co.) at -80°C with an intensifying screen. Analysis of immunoprecipitation was performed in a Molecular Dynamics Phosphor Imager (Sunnyvale, CA) with the included Imagequant software. Serum samples able to immunoprecipitate at least 80 % of photoaffinity-labeled receptors were used.

Phosphorylation of α_{1d} -ARs. Rat-1 fibroblasts were cultured in culture dishes (diameter 10 cms). Cells reaching confluence were serum starved for 24 h. The day of the experiment fibroblasts were maintained in phosphate-free DMEM during 1 h, then

incubated in 3 ml of the same medium containing [³²P]Pi (50 μCi/ml) for 3 h at 37 °C. Labeled cells were stimulated with the agents indicated, then they were washed with ice-cold phosphate buffered saline and solubilized with 1.0 ml of ice-cold solubilization buffer (as used for immunoprecipitation, see above) supplemented with 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM p-serine and 1 mM p-threonine. The plates were maintained for 1 h on ice; then the extracts were centrifuged at 12,700 X g for 15 min, at 4 °C, and the supernatants were immunoprecipitated as described above. Receptor phosphorylation was detected with a Molecular Dynamics Phosphor Imager and quantified with its Imagequant software. Data were within the linear range of detection of the apparatus and were plotted using Prism 3 (GraphPad Software). In some experiments the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and the proteins transferred to nitrocellulose membranes. Western blotting was performed using the serum obtained against the GST-α_{1d}-AR fusion protein or the commercial antiserum, a conjugated secondary antibody and the chemiluminiscent system of Pierce (Rockford, IL).

RESULTS

The basal intracellular concentration of calcium was 162 ± 18 nM (mean \pm S. E. M., $n=16$) in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1d} -ARs. In agreement with previous results (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996) NE induced an almost immediate increase in $[Ca^{2+}]_i$ (to 500-700 nM at 10 μ M NE). The effect of NE was concentration-dependent with an EC_{50} of 95 ± 10 nM (mean \pm S. E. M., $n=4$). TPA (1 μ M) induced a small but consistent decrease in the basal level of calcium (decrease of 53 ± 4 nM; mean \pm S. E. M., $n=10$) (Fig. 1). This decrease in basal $[Ca^{2+}]_i$ has also been observed with inverse agonists and it has been suggested that this effect of TPA is due to blockade of the constitutive activity of these receptors (García-Sáinz and Torres-Padilla, 1999). If the incubation is continued the level of calcium slowly increased towards the basal level observed before the addition of TPA. The effect of NE was markedly decreased after the addition of TPA suggesting that activation of PKC blocked/desensitized α_{1d} -ARs (Fig. 1). The response to NE in the presence of TPA was markedly decreased at all the concentrations tested and the concentration-response curve was clearly shifted to the right as compared to that of control cells (Fig. 1) (no estimate of the EC_{50} was made since even at the biggest concentration tested (100 μ M NE) no clear saturation was observed). Using also this parameter, it was observed that when the cells were treated with 10 μ M NE a transient calcium response was observed but that subsequent additions of NE did not result in any additional response (data not shown, see García-Sáinz and Torres-Padilla, 1999). These data are consistent with the hypothesis that α_{1d} -ARs are subjected to homologous and heterologous desensitizations.

The ability of NE to increase the binding of [³⁵S]GTPγS to membranes was studied in order to substantiate these findings at a subcellular level. For this purpose, cells were incubated in the absence of any agent, 10 μM NE or 1 μM TPA, membranes were prepared and NE-stimulated [³⁵S]GTPγS binding was studied. It can be observed in Fig. 2, that in membranes from control cells NE induced an increase in guanine nucleotide binding of ~30%. This effect was significantly decreased in membranes obtained from cells treated with NE (p< 0.05 vs. control) or TPA (p< 0.01 vs. control) (Fig. 2). Incubation with 1 μM lysophosphatidic acid also markedly decreased NE-induced [³⁵S]GTPγS binding to membranes (p< 0.01 vs. control) (Fig. 2).

To study the possibility that the desensitization processes could be associated to receptor phosphorylation we proceeded to perform receptor photoaffinity labeling and immunoprecipitation. Membranes that were incubated with [¹²⁵I]arylazidoprazosin and subjected to UV irradiation were employed to define the conditions for immunoprecipitation. Photoaffinity labeling of membranes of rat-1 fibroblasts expressing α_{1d}-ARs resulted in the labeling of a major broad band of Mr 70-80 kDa; the labeling of this band was competed by phentolamine indicating that it does correspond the α_{1d}-ARs. Three other bands were observed in our photoaffinity labeling studies. A band of ~ 43 kDa was observed whose labeling was also blocked by phentolamine (Fig. 3). This may represent a proteolytic fragment of the receptor either present in whole cells or generated during the experimental procedures, in spite of the presence of protease inhibitors. A faint band of ~38 kDa, whose labeling was not blocked by phentolamine, was also detected. Similarly a band of high molecular weight (> 150 kDa) was observed (Fig. 3). High molecular weight bands have been observed with the other subtypes of this receptor

(Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 2000); it is possible that they may represent oligomeric forms (Hébert and Bouvier, 1998) or aggregates with other proteins that are resistant to the conditions used for electrophoresis. No specific labeling was observed in membranes obtained from untransfected wild type rat-1 fibroblasts (data not shown).

Photolabeled membranes were solubilized and the ability of the antiserum (generated with the GST- α_{1d} -AR fusion protein) to immunoprecipitate the receptor was tested. It can be observed in Fig. 3 that the immune serum was very efficient in immunoprecipitating the receptor (> 80%) and also immunoprecipitated the ~ 43 kDa putative receptor fragment and the high molecular weight bands (Fig. 3). Preimmune sera were unable to immunoprecipitate the receptor (Fig. 3).

Next, we examined if the receptor was phosphorylated under basal and stimulated conditions. Three major ^{32}P -labeled bands were observed (Fig. 4): a) a broad band of Mr ~ 70-80 kDa, b) a band of high molecular weight (Mr >150 kDa) and c) a band of Mr ~ 43 kDa. These are the same bands observed in the photoaffinity labeling experiments and that were immunoprecipitated by the α_{1d} -AR antiserum. No immunoprecipitation of these bands was observed when the receptor peptide was added. The bands corresponding to the receptor and the high molecular band (putative oligomers/aggregates) were also recognized in Western blots using the same antiserum. It was not possible to identify the ~ 43 kDa band in the Western blots due to marked interference by the Ig G heavy chain signal. A commercial antibody generated against the α_{1d} -AR carboxyl terminus decapeptide also identified the same bands (data not shown). Phosphorylation experiments were also carried out using untransfected wild type rat-1 fibroblasts. In

immunoprecipitates from these cells a few phosphorylated bands were observed that did not correspond to the receptor. The labeling of these bands was at least 10-times less than that observed in the α_{1d} -ARs in parallel experiments (data not shown).

When rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1d} -ARs were stimulated with NE or TPA a marked stimulation of the labeling of the band corresponding to the receptor was observed (10 μ M NE, 205 \pm 13 % of basal labeling, mean \pm S.E.M., n= 11, p< 0.001 vs. basal; 1 μ M TPA 269 \pm 20 % of basal labeling, mean \pm n= 10, p< 0.001 vs. basal). There were also increases in the labeling of the high molecular weigh band and the \sim 43 kDa band in cells stimulated with NE and TPA. In addition, in cells stimulated with these agents faint labeled bands in the Mr 55-65 kDa region were observed in some experiments (Fig 4). No bands were present when the immunoprecipitation was carried out using preimmune sera or when the α_{1d} -AR peptide (released from the fusion protein by thrombin-catalyzed proteolysis) was added during the immunoprecipitation (data not shown). These data indicate that α_{1d} -ARs are phosphorylated in the basal (non stimulated) state and that NE and TPA markedly increased such phosphorylation.

The concentration-response curves for NE and TPA and the time-course of their effects are presented in Figs. 5 and 6, respectively. The effect of NE was concentration dependent (EC_{50} 75 \pm 20 nM, mean \pm S. E. M., n= 5). It was surprising that this dose-response was shifted to the left \sim 1 order of magnitude when compared to those observed with the other subtypes (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 2000). Similarly, the effect of TPA was concentration-dependent (EC_{50} 25 \pm 10 nM, mean \pm S. E. M., n= 4). The effect of NE was rapid reaching its maximum within the first minute, remained at this level another four minutes and declined towards basal level afterwards

(Fig. 6). In contrast, the effect of TPA was slightly slower reaching the maximum at 5 min and this high level of receptor phosphorylation was maintained for 60 min.

As expected the effect of TPA was markedly inhibited by 300 nM staurosporine, 300 nM Ro 31-8220 or 1 μ M bisindolylmaleimide I, inhibitors of PKC ($p < 0.001$ vs TPA alone in all these cases), but not by 100 nM wortmannin, selective inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (Fig. 7). The α_{1d} -AR phosphorylation induced by NE was not altered by any of these kinase inhibitors (not shown). The inhibitors were without effect on basal phosphorylation at the concentration tested (data not shown).

We have previously shown that activation of receptors endogenously expressed in rat-1 fibroblasts, such as endothelin ET_A receptors, lysophosphatidic acid receptors and bradykinin B2 receptors results in α_{1b} -AR phosphorylation (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1999; Casas-González *et al.*, 2000). As shown in Fig. 8, endothelin ($p < 0.001$ vs. basal) and lysophosphatidic acid ($p < 0.005$ vs basal) induced marked phosphorylation of α_{1d} -ARs and bradykinin a smaller but significant effect ($p < 0.05$ vs. basal).

DISCUSSION

Nearly all studies on α_1 -AR desensitization/phosphorylation have been performed using α_{1b} -ARs, the first subtype that was cloned (Cotecchia *et al.*, 1988) and considered as prototypic of this family (reviewed in García-Sáinz *et al.*, 2000). Only very recently data on α_{1a} -AR phosphorylation were reported (Vázquez-Prado *et al.*, 2000). There are considerable differences in the sensitivity of the different subtypes to desensitization by activation of PKC (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996); the α_{1d} -AR subtype was very sensitive to the action of TPA, which suggested the possibility that this receptor subtype could also be regulated by phosphorylation (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996).

α_{1d} -ARs have been particularly intriguing and difficult to study. There were great complications in defining them as a new receptor subtype (Lomasney *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991; Hieble *et al.* 1995) and detection of these receptors by radioligand binding techniques has also been very problematic (Yang *et al.*, 1997). Nevertheless, α_{1d} -ARs are functionally expressed in many arteries (Piascik *et al.*, 1995; Villalobos-Molina *et al.*, 1997; Hrometz *et al.*, 1999, reviewed in García-Sáinz *et al.*, 1999) and seem to be important in the regulation of vascular tone *in vivo* and associated to the pathogenesis/maintenance of hypertension (Villalobos-Molina *et al.*, 1999). Therefore, knowledge on the modulation of these receptors is important.

It has been observed that activation of α_{1d} -ARs induces a weak response in second messenger generation (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996; Theroux *et al.*, 1996). This was confirmed in the present study where we observed that NE induced a rapid but relatively small increase in intracellular calcium, when compared to those

observed in cells expressing similar densities of the other subtypes: α_{1a} -ARs ($\sim 2 \mu\text{M}$) or α_{1b} -ARs ($\sim 1 \mu\text{M}$) (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996; Vázquez-Prado *et al.*, 2000). It is not currently known if this is an intrinsic property of these receptors or due to modulation of their activity; the constitutive activity of α_{1d} -ARs and their cellular distribution may contribute.

Inverse agonism has been observed with the different α_1 -AR subtypes (García-Sáinz and Torres-Padilla, 1999; Rossier *et al.*, 1999; McCune *et al.*, 2000). In particular, α_{1d} -ARs have significant activity in the absence of agonists (constitutive activity) and many antagonists behave, in fact, as inverse agonists (García-Sáinz and Torres-Padilla, 1999; McCune *et al.*, 2000). TPA decreases the intracellular calcium concentration putatively by blocking the receptor activity (García-Sáinz and Torres-Padilla, 1999). It is known that α_{1b} -ARs are located on the cell surface in unstimulated cells and that agonists induce internalization (McCune *et al.*, 2000; García-Sáinz *et al.*, 2000); receptor internalization in the absence of agonists has been observed with constitutively active mutants (McCune *et al.*, 2000). It was very recently shown that in unstimulated cells a large fraction of wild type α_{1d} -ARs are not located on the cell surface but rather intracellularly in a perinuclear orientation (McCune *et al.*, 2000). This was observed in transfected cells and also in cells that naturally express these receptors (McCune *et al.*, 2000). In addition, inverse agonists shifted the α_{1d} -AR cellular distribution towards the plasma membrane location (McCune *et al.*, 2000). It is possible that the constitutive activity of α_{1d} -ARs, their basal phosphorylation, their cellular location and the relatively small second messenger response that their activation by agonists induces, could be causally related. However, this needs to be experimentally tested.

In the present study, the ability of NE and TPA to block/desensitize α_{1d} -ARs in whole cells was confirmed and extended. NE-stimulated [35 S]GTP γ S binding reflects the ability of agonist-activated α_1 -ARs to activate G-protein guanine nucleotide exchange and it is, therefore, an index of receptor-G protein coupling. Thus, our data with membranes confirmed what was observed in whole cells, i. e., that α_{1d} -ARs were subjected to homologous and heterologous desensitizations. Furthermore, the data indicate that the change(s) induced by the cell treatments were stable and persisted after cell disruption and membrane isolation.

A major goal in our study was to identify and immunoprecipitate α_{1d} -ARs in order to study the possibility of receptor phosphorylation. The photoaffinity labeling studies identified the receptor as a major broad band of Mr 70-80 kDa. The molecular weight of the peptide chain of the receptor is ~ 60 kDa (Lomasney *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991). The broadness of the band and the difference in size suggest that α_{1d} -ARs are extensively glycosylated as predicted by the sequence (Lomasney *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991) and as it has been experimentally shown for other α_1 -ARs (Sawutz *et al.*, 1987). Difficulties to photolabel α_{1d} -ARs have been reported (Perez *et al.*, 1991). However, with the current protocol we did not have any major problem. To the best of our knowledge the only other α_{1d} -AR visualized by photoaffinity labeling is the human isoform (Schwinn and Dwatra, 1998) and the reported data are consistent with our observations. α_{1d} -ARs were effectively immunoprecipitated and further identified by Western blotting using two different antibodies directed against different epitopes.

Our present data show that α_{1d} -ARs are phosphoproteins whose basal phosphorylation is increased by the agonist, NE, and by activation of PKC by TPA. The

effects of these agents were concentration-dependent and their time-courses were similar to those observed for the other subtypes (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 2000). As expected, PKC inhibitors blocked the effect of PMA. α_{1d} -AR phosphorylation induced by NE was not blocked by these agents suggesting a major role of GRKs in this effect, as shown for the α_{1b} -AR subtype (Lattion *et al.*, 1994). Nevertheless, the data do not exclude possible role(s) of PKC since the actions could be redundant and interplay between these kinases may exist.

α_{1d} -ARs were phosphorylated in response to activation of non adrenergic receptors endogenously expressed in the cells. As shown, membranes from cells incubated in the presence of lysophosphatidic acid had a decreased NE-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding, clearly indicating that the receptor phosphorylation induced by the lysophospholipid mediator had functional repercussion. This is consistent with what has been observed for the α_{1b} -AR (Casas-González *et al.*, 2000). The α_{1b} -AR phosphorylation induced by endothelin is mediated through pertussis toxin-insensitive G proteins, putatively of the Gq family, and involves PKC and other yet unidentified kinases (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; García-Sáinz *et al.*, 2000). In contrast, the effect of lysophosphatidic acid is mediated through pertussis toxin-sensitive G proteins, putatively of the Gi family, and is mediated through phosphoinositide 3-kinase and PKC (Casas-González *et al.*, 2000; García-Sáinz *et al.*, 2000). It is likely that similar processes may participate in the effects here described on the α_{1d} -ARs; however, this needs to be experimentally shown.

In summary, here we first show that α_{1d} -ARs are phosphoproteins and that the phosphorylation state of these receptors is increased by NE, by direct activation of PKC,

and via crosstalk with other receptors endogenously expressed in rat-1 fibroblast. In addition, we showed that the phosphorylations induced by NE, TPA and LPA had functional repercussion. These data complete an initial picture on α_1 -AR phosphorylation, and indicate that the three receptor subtypes are subjected to this covalent modification. The α_{1b} and α_{1d} subtypes are efficiently phosphorylated and such phosphorylations have functional repercussion. In contrast, the α_{1a} subtype is phosphorylated to a much lesser extent and phosphorylation has only marginal functional significance. The role of these phosphorylations in a physiological context is yet unknown. It has been shown that in cultured neonatal heart myocytes, that express the three α_1 -ARs subtypes, most of the longer-term actions are mediated through the α_{1a} subtype (Knowlton *et al.*, 1993; Rokosh *et al.*, 1996). It is tempting to speculate that the susceptibility to phosphorylation may play a role in determining the intensity of acute and longer-term actions of adrenergic amines, the cell responsiveness and the cellular distribution of the receptors under basal, agonist-stimulated and crosstalk-regulated conditions. Further experiments will be required using cells that endogenously express one or more of these receptor subtypes to address these questions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to: Drs. R. J. Lefkowitz, M. G. Caron and L. Allen for the donation of the transfected rat-1 fibroblasts; Dr. R. M. Graham for the plasmid containing the α_{1d} -AR cDNA; Dr. Guillermo Mendoza of the School of Medicine of our University for kindly sequencing the fusion protein and the receptor peptide; Dr. Fernando López-Casillas for the donation of the wild type rat-1 fibroblasts and to the staff of the Vivarium, Computer Services Unit and Molecular Biology Unit of our Institute for their help and advise.

REFERENCES

Casas-González P, Vázquez-Prado J and García-Sáinz JA (2000) Lysophosphatidic acid modulates α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation and function. Roles of G_i and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol* **57**:1027-1033.

Cotecchia S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG and Kobilka BK (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:7159-7163.

Diviani D, Lattion AL, Larbi N, Kunapuli P, Pronin A, Benovic JL and Cotecchia S (1996) Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **271**:5049-5058.

Ferguson S, Zhang J, Barak LS and Caron MG (1997) Pleiotropic role for GRKs and β -arrestins in receptor regulation. *News Physiol Sci* **12**:145-151.

García-Sáinz JA and Torres-Padilla ME (1999a) Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1A} -adrenoceptors. *FEBS Lett* **443**:277-281.

García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J and Villalobos-Molina R (1999b) α_1 -Adrenoceptors: subtypes, signaling and roles in health and disease. *Arch Med Res* **31**:449-458.

García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J and Medina LC (2000) α_1 -Adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol* **389**:1-12.

Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**:3440-3450.

Hébert TE and Bouvier M (1998) Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol* **76**:1-11.

Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP and Ruffolo RR Jr (1995) International Union of Pharmacology. X. Recommendations for nomenclature of α_1 -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* **47**:267-270.

Hrometz SL, Edelmann SE, McCune DF, Olges JR, Hadley RW, Perez DM and Piascik MT (1999) Expression of multiple α_1 -adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. *J Pharmacol Exp Ther* **290**:452-463.

Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH and Chien KR (1993) The α_{1A} -adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* **268**:15374-15380.

Krupnick JG and Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **38**:289-319.

Kurose H and Lefkowitz RJ (1994) Differential desensitization and phosphorylation of three cloned and transfected α_2 -adrenergic receptor subtypes. *J Biol Chem* **269**:10093-10099.

Lattion A-L, Diviani D and Cotecchia S (1994) Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **269**:22887-22893.

LaVallie ER, Smith DB and Riggs P (1997) Enzymatic and Chemical Cleavage of Fusion Proteins, in *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K, eds.) pp. 16.20-16.21. Willey, New York.

Leeb-Lundberg LMF, Cotecchia S, Lomasney JW, DeBernardis JF, Lefkowitz RJ and Caron MG (1985) Phorbol esters promote α_1 -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:5651-5655.

Liggett SB, Fredman NJ, Schwinn DA and Lefkowitz RJ (1993) Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric β_3/β_2 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3665-3669.

Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung W-Y, Schwinn DA, Yang-Feng TL, Brownstein M, Lefkowitz RJ and Caron MG (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1A} -adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem* **266**:6365-6369.

McCune DF, Edelman SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJJ, Perez DM and Piascik MT (2000) Regulation of the cellular localization and signaling properties of the α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol Pharmacol* **57**:659-666.

Medina LC, Vázquez-Prado J, Torres-Padilla ME, Mendoza-Mendoza A, Cruz-Muñoz ME and García-Sáinz JA (1998) Crosstalk: phosphorylation of α_{1B} -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett* **422**:141-145.

Perez DM, Piascik MT and Graham RM (1991) Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an α_{1D} -adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol* **40**:876-883.

Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL Jr and Perez DM (1995) The specific contribution of the novel α_{1D} adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **275**:1583-1589.

Pitcher JA, Freedman NJ and Lefkowitz JR (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Ann Rev Biochem* **67**:653-692.

Rokosh DG, Stewart AFR, Chang KC, Bailey BA, Karliner JS, Camacho SA, Long CS and Simpson PC (1996) α_1 -adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by α_1 -adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and In vivo. *J Biol Chem* **271**:5839-5843.

Rossier O, Abuin L, Fanelli F, Leonardi A and Cotecchia S (1999) Inverse agonism and neutral antagonism at α_{1a} - and α_{1b} -adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* **56**:858-866.

Sawutz DG, Lanier SM, Warren CD and Graham RM (1987) Glycosylation of the mammalian α_1 -adrenergic receptor by complex type N-linked oligosaccharides. *Mol Pharmacol* **32**:565-571.

Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Frameau RT, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ and Cotecchia S (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenergic subtype. *J Biol Chem* **265**:8183-8189.

Schwinn DA and Kwatra MM (1998) Expression and regulation of α_1 -adrenergic receptors in human tissues, in *Advances in Pharmacology* (Goldstein DS, Eisenhoffer G, and McCarty R. eds.) pp. 390-394, Academic press, San Diego.

Theroux TL, Esbenshade TA, Peavy RD and Minneman KP (1996) Coupling efficiencies of human α_1 -adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. *Mol Pharmacol* **50**:1376-1387.

Vázquez-Prado J and García-Sáinz JA (1996) Effect of phorbol myristate acetate on α_1 -adrenergic action in cells expressing recombinant α_1 -adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol* **50**:17-22.

Vázquez-Prado J, Medina LC and García-Sáinz JA (1997) Activation of endothelin ET_A receptors induce phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors in rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* **272**:27330-27337.

Vázquez-Prado J, Medina LC, Romero MT, González-Espinosa C and García-Sáinz JA (2000) Norepinephrine and phorbol ester-induced phosphorylation of α_{1a} -adrenergic receptors. Functional aspects. *J Biol Chem* **275**:6553-6559.

Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ and Ibarra M (1997) α_{1D} - and α_{1A} -Adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery. *Eur J Pharmacol* **322**:225-227.

Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ and Ibarra M (1999) Functional evidence of α_{1D} -adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Brit J Pharmacol* **126**:1534-1536.

Wieland T and Jakobs KH (1994) Measurements of receptor-stimulated guanosine 5'-O-(gamma-thio)triphosphate binding by G proteins, in *Methods in Enzymology* (Iyengar R, ed.) pp. 3-13, Academic Press, London.

Yang M, Verfürth F, Büscher R and Michel MC (1997) Is α_{1D} -adrenoceptor protein detectable in rat tissues? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355**:438-446.

Footnote:

This research was supported in part by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN 205100) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (27569N).

Fig. 1. Effect of TPA on norepinephrine-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1d} -ARs were loaded with Fura-2/AM and $[Ca^{2+}]_i$ recorded. *Left panel:* concentration-response curves for the effects of norepinephrine on $[Ca^{2+}]_i$ in cells incubated for 5 min in the absence (empty circles) or presence (filled circles) of 1 μ M TPA. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4-6 experiments using different cell cultures. *Right panels:* representative traces of the effects of 10 μ M NE and 1 μ M TPA on $[Ca^{2+}]_i$.

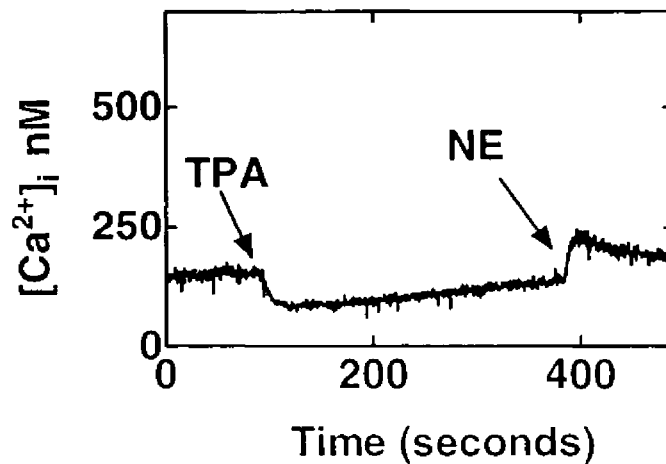
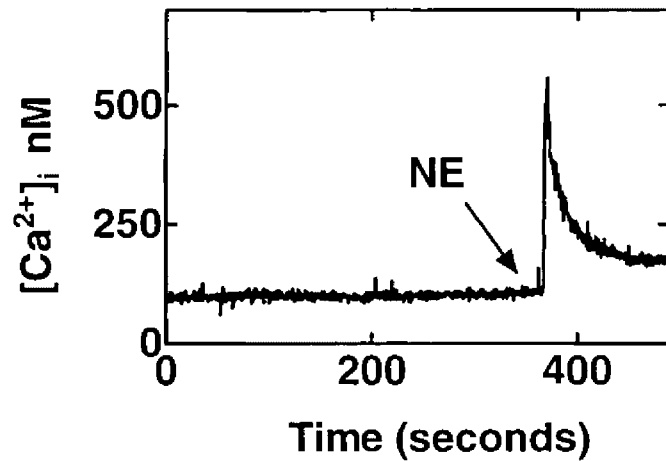
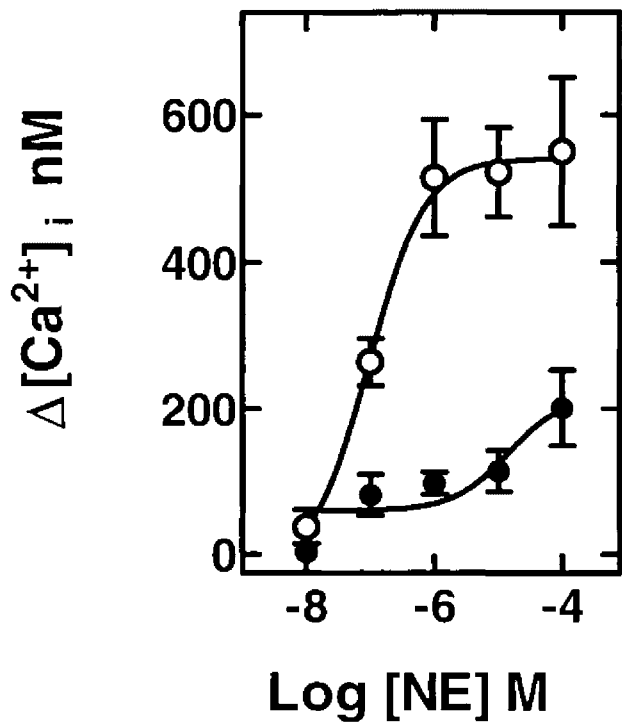


Fig. 2. *In vitro* NE-stimulated [³⁵S]GTPγS binding to membranes. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1d}-ARs were incubated for 5 min in the absence of agonist (C, open bar), in the presence of 10 μM NE (dashed bar), 1 μM TPA (solid bar) or 1 μM lysophosphatidic acid (LPA)(crisscrossed bar) and membranes were prepared. Plotted are the means and vertical lines represent the S. E. M. of 15-18 determinations using membranes obtained from 4 different cultures. The mean vehicle-stimulated [³⁵S]GTPγS binding was normalized to 100 % for each group.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

NE- STIMULATED
[³⁵S]GTP_γS BINDING
(% of basal)

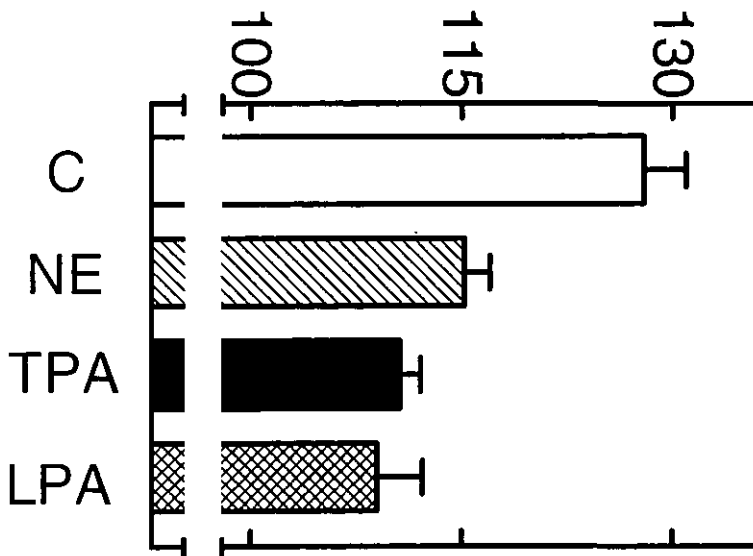


Fig. 3. Photoaffinity labeling and immunoprecipitation of the α_{1d} -AR. Membranes from transfected Rat-1 fibroblasts were labeled with [125 I]arylazidoprazosin (125 I-az-pz) in the absence (-) or presence (+) of 10 μ M phentolamine (phento). [125 I]arylazidoprazosin-labeled membranes were solubilized and the α_{1d} -AR immunoprecipitated as described in Experimental Procedures; as a control, pre-immune serum was used (pre-imm). A representative autoradiograph of at least three independent experiments is shown.

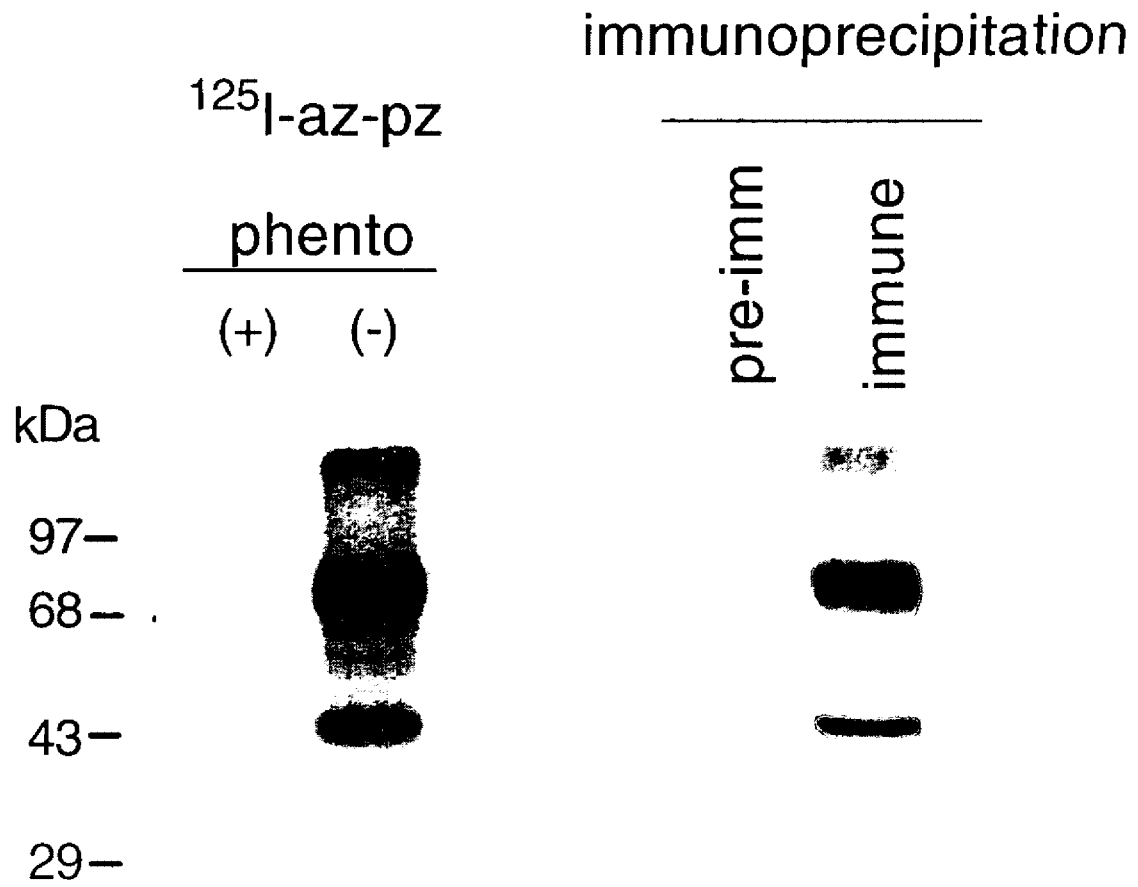


Fig. 4. Effects of norepinephrine and TPA on α_{1d} -AR phosphorylation and Western blot of the immunoprecipitate. *Left panel:* Rat-1 fibroblasts expressing α_{1d} -ARs were metabolically labeled with [32 P]Pi and incubated for 5 min in the absence of any agent (B), with 10 μ M NE or 1 μ M TPA. Position of pre-stained molecular weight markers is indicated. *Left panel:* Immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and Western blotted. A representative autoradiograph of at least ten independent experiments is shown. The Western blot was repeated at least three times with identical results.

PHOSPHORYLATION

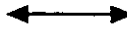
WESTERN BLOT

kDa

97 —

68 —

43 —



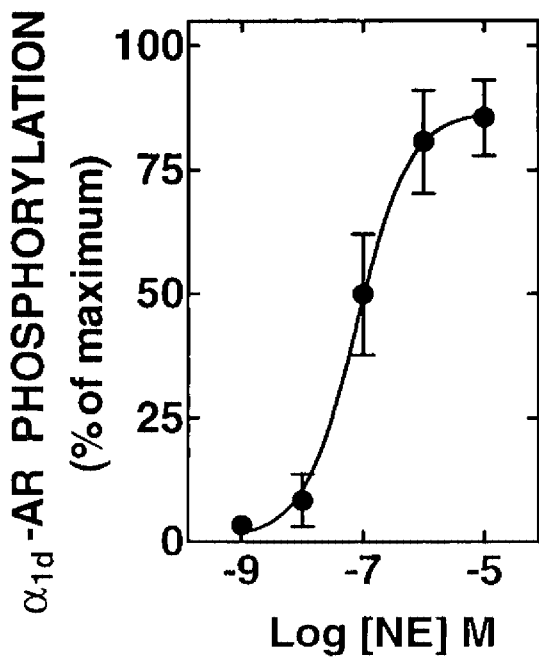
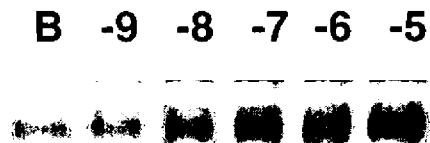
**Ig G
heavy chain**

B NE TPA

B NE TPA

Fig. 5. Dose-response curves for the effects of norepinephrine and TPA on α_{1d} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1d} -ARs were metabolically labeled with [32 P]Pi and incubated with the indicated concentrations of NE or TPA for 5 min. Basal phosphorylation was subtracted and the highest value was considered as 100% in each experiment. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of four experiments; representative autoradiographs for the effects of norepinephrine and TPA are shown.

Log [NE] M



Log [TPA] M

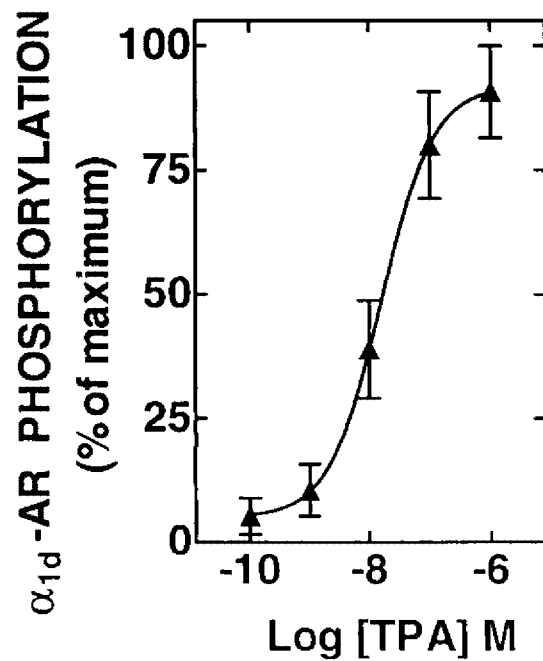
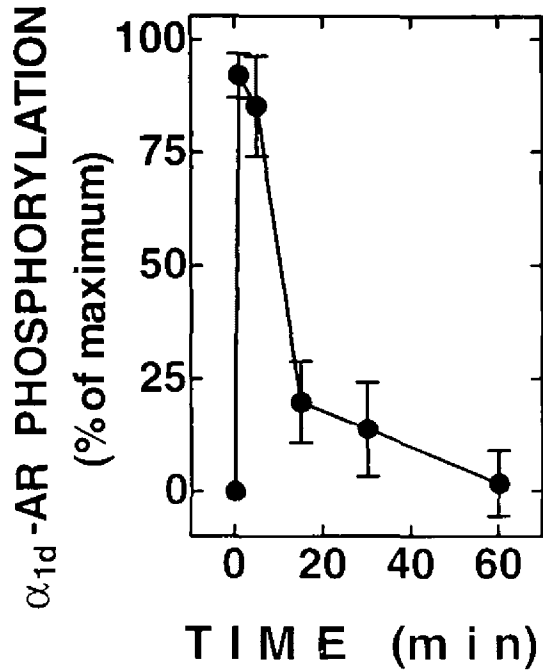


Fig. 6. Time-courses of the effects of norepinephrine and TPA on α_{1d} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1d} -ARs were metabolically labeled with [32 P]Pi and incubated for the times indicated with 10 μ M NE (left panel) or 1 μ M TPA (right panel). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of four independent experiments in each case. Basal phosphorylation was subtracted and the highest value was considered as 100% in each experiment. Representative autoradiographs for the effects of NE and TPA are shown.

Time (min)

0 1 5 15 30 60



Time (min)

0 1 5 15 30 60

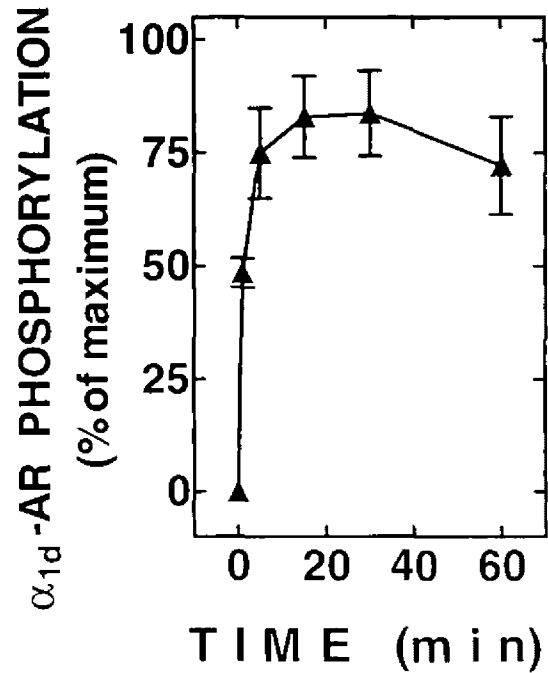


Fig. 7. Effect of protein kinase C inhibitors and wortmannin on TPA-induced α_{1d} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1d} -ARs were metabolically labeled with [32 P]Pi, pre-incubated for 30 min with 300 nM staurosporine (STAU), 1 μ M bisindolylmaleimide I (BIM), 300 nM Ro 31-8220 (Ro) or 100 nM wortmannin (WORT) and then incubated with 1 μ M TPA for further 5 min. Basal phosphorylation was subtracted and the effect of 1 μ M TPA alone was considered as 100% in each experiment. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of six independent experiments. A representative autoradiograph is shown.

α_{1d} -AR PHOSPHORYLATION
(% of TPA)

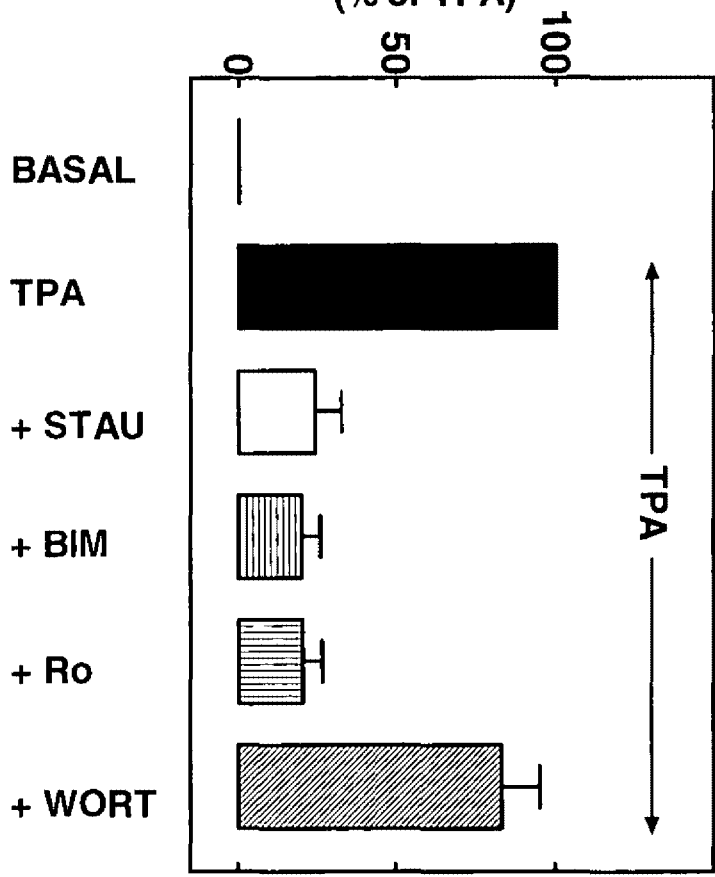
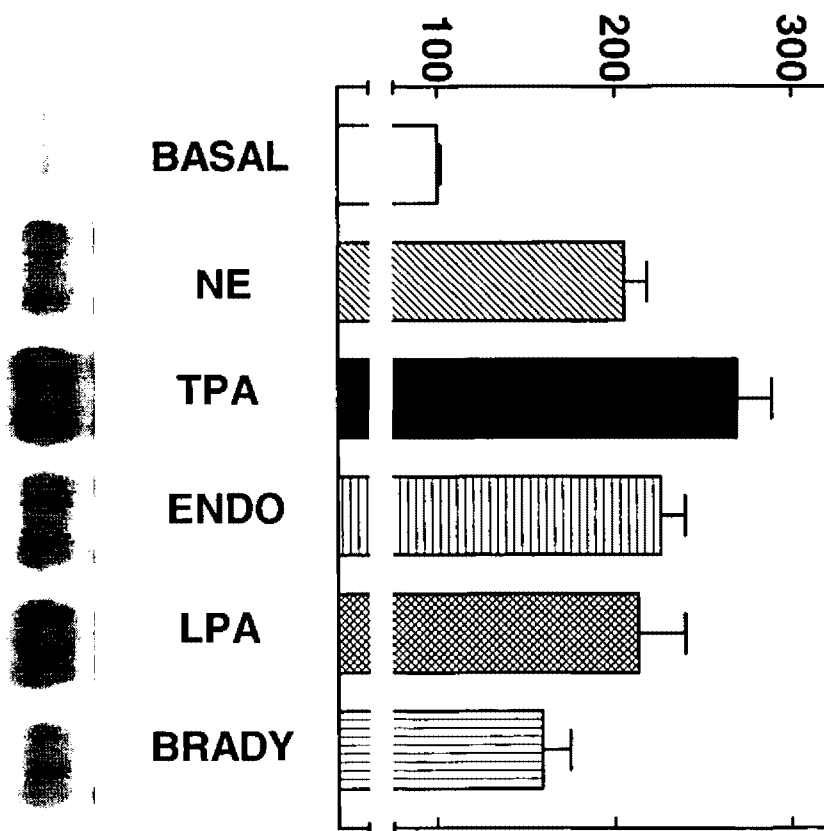


Fig. 8. Effect of NE, TPA, endothelin, lysophosphatidic acid and bradykinin on α_{1d} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1d} -ARs were metabolically labeled with [32 P]Pi and incubated for 5 min in the absence of any agent (BASAL) or with 10 μ M NE, 1 μ M TPA, 10 nM endothelin (ENDO), 1 μ M lysophosphatidic acid (LPA) or 1 μ M bradykinin (BRADY). Basal phosphorylation was considered as 100% in each experiment. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of four independent experiments. A representative autoradiograph is shown.

α_{1d} -AR PHOSPHORYLATION
(% of basal)



Discusion

En el presente trabajo estudiamos el papel de la fosforilación en la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico.

La inmunoprecipitación del receptor α_{1d} -adrenérgico expresado en fibroblastos rat-1, demostró ser altamente específica, como lo evidenció la capacidad del suero inmune para inmunoprecipitar las bandas que resultaron positivas para el marcaje de fotoafinidad del receptor, con al menos 80% de eficiencia. Ensayos de western blot con anticuerpos comerciales y con el anticuerpo generado con la proteína de fusión GST- α_{1d} , permitieron establecer que en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, la mayor parte del receptor migra en una masa molecular de ~70 KDa. Estos datos son acordes con los reportados en la literatura donde se ha demostrado el fotomarcaje del receptor α_{1d} humano (Schwinn and Kwatra, 1998). Cabe mencionar que el receptor α_{1d} -adrenérgico de rata no había sido marcado por fotoafinidad. Estos datos nos permitieron realizar los experimentos de fosforilación.

Los receptores α_1 -adrenérgicos tienen múltiples funciones fisiológicas, por lo que el control de su actividad es importante y tiene perspectivas terapéuticas. El primer subtipo del cual se describió la fosforilación fue el α_{1b} (Leeb-Ludberg, et al., 1987), y recientemente el α_{1a} (Vázquez-Prado, et al., 2000). Hasta la fecha no existían reportes sobre la fosforilación del α_{1d} . No obstante se sabe que los 3 subtipos tienen una regulación funcional diferente, por ejemplo, en su sensibilidad a sufrir desensibilización inducida por norepinefrina o por activación de la PKC (Vázquez-Prado & García-Sáinz, 1996). Existen familias de receptores en las cuales cada subtipo es regulado de manera diferencial por fosforilación, como es el caso de la familia de receptores β -adrenérgicos (Nantel, et al., 1993), esto es fisiológicamente relevante pues juegan un papel diferente en la respuesta de la célula a estímulos hormonales en diferentes contextos fisiológicos y patológicos.

El primer aspecto estudiado en el presente trabajo fue la desensibilización del receptor α_{1D} -adrenérgico. La generación de segundos mensajeros por activación del receptor fue monitoreada como concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). La estimulación del receptor α_{1D} -adrenérgico por su agonista norepinefrina, produce un incremento en la concentración de calcio intracelular de al menos 3 veces la concentración basal. La preincubación de las células que expresan el receptor α_{1D} -adrenérgico con NE o TPA disminuyó significativamente la concentración de calcio intracelular inducida por noradrenalina. Estos datos evidenciaron que estos receptores sufren desensibilización homóloga (dependiente del agonista) y desensibilización heteróloga (independiente del agonista). Estas observaciones se corroboraron con los datos de unión de GTP γ S en membranas de células que expresan al receptor, donde el pegado de este nucleótido, inducido por NE, disminuyó como consecuencia de la preincubación de las células con NE o TPA. Dado que el recambio de GDP por GTP por la subunidad alfa de las proteínas G heterotriméricas es el primer evento en la activación de su cascada de transducción, la disminución en el pegado del análogo no hidrolizable de GTP (GTP γ S), nos permite establecer que la atenuación de la capacidad de respuesta del receptor se da desde el inicio de la vía de señalización, involucrando directamente al receptor y modificando su interacción con la proteína G.

La desensibilización se presenta después de 5 minutos de exposición de las células a NE o TPA, esto correlaciona con el patrón temporal de la fosforilación. En el caso de norepinefrina el máximo de fosforilación se alcanza al minuto de estimulación, y se mantiene por 5 minutos, para después caer paulatinamente. Esto pone de manifiesto que la fosforilación es uno de los eventos que ocurren durante la desensibilización del receptor α_{1D} -adrenérgico, cabe mencionar que existen receptores que son fosforilados sin que presenten desensibilización, como ocurre para el receptor α_{1A} -adrenérgico (Vázquez-Prado, et al., 2000). El comportamiento de la fosforilación del receptor con respecto al tiempo, es acorde con el modelo de desensibilización dependiente del agonista,

que involucra internalización. Ya ha sido demostrado que estos receptores se internalizan de manera rápida (minutos) en respuesta a su agonista (McCune et al., 2000). La fosforilación inducida por NE no es sensible a inhibidores de la PKC, esto sugieren que esta fosforilación es dependiente de GRK, sin embargo esto debe demostrarse experimentalmente. Nuestros datos, junto con datos existentes en la literatura (Vázquez-Prado & García Sáinz, 1996; McCune et al., 2000), sugieren fuertemente que el receptor α_{1d} -adrenérgico experimenta desensibilización homóloga dependiente de fosforilación y que involucra internalización, probablemente por una ruta dependiente de arrestinas.

El receptor α_{1d} -adrenérgico presenta desensibilización heteróloga por activación farmacológica de la PKC con TPA, esta desensibilización mostrada en los experimentos de liberación de calcio y de pegado de GTP γ S va acompañada de fosforilación del receptor, la cual es dosis dependiente y alcanza su máximo a los 5 minutos de exposición de las células al éster de forbol, manteniéndose hasta después de una hora. Esta fosforilación es importante para la regulación heteróloga del receptor α_{1d} , pues la fosforilación inducida por TPA, es sensible a inhibidores de la PKC, esta cinasa probablemente fosforila de manera directa al receptor, lo cual sugiere que el receptor es sensible a cualquier estímulo que active a dicha cinasa. El receptor estudiado se fosforila por estimulación de los receptores a endotelina (ET_A) y bradicinina (B2), estos están acoplados a proteínas Gq en su vía de señalización un efector principal es la PKC. Esto sugiere que la fosforilación cruzada del receptor α_{1d} es dependiente de la activación de la PKC y también que la actividad de otros receptores acoplados a Gq lleva a desensibilización del receptor α_{1d} . Esto ha sido explorado con más detalle para el receptor α_{1b} -adrenérgico, donde la fosforilación dependiente de endotelina mostró tener importancia funcional y llevar al receptor α_{1b} a desensibilización (Vázquez-Prado, et al., 1997). Sorpresivamente el receptor B2 de bradicinina no induce desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico (Medina, et al., 1998). Como ya se mencionó, ambos receptores ET_A y B2, se acoplan a proteínas Gq que activan la vía de recambio de fosfoinosítidos-calcio, sin embargo

las diferencias encontradas en los estudios de regulación cruzada con el receptor α_{1b} -adrenérgico, demuestran que la regulación de una determinada cascada de transducción es diferente y específica para cada receptor.

El receptor α_{1d} , se fosforila también por activación de los receptores a ácido lisofosfatídico lo cual sugiere una interacción con receptores acoplados a Gi. Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico por activación del receptor a LPA, lleva a la desensibilización del receptor adrenérgico y es dependiente de la activación de PKC y de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) (Casas-González, 2000). En el caso del receptor α_{1d} , es de gran interés estudiar las consecuencias funcionales y las rutas de transducción involucradas con su fosforilación dependiente de LPA.

En estudios de nuestro laboratorio se ha demostrado que el receptor α_{1d} tiene una elevada actividad constitutiva, como lo demostró el hecho de que varios ligandos se comportan como agonistas inversos, disminuyendo la actividad basal del receptor en la generación de segundos mensajeros (García-Sáinz & Torres-Padilla, 1999).

El estudio de la localización subcelular del receptor por inmunocitoquímica monitoreada en confocal, ha demostrado que el receptor α_{1d} se encuentra internalizado en condiciones basales, además la incubación de estas células con un antagonista induce una relocalización del receptor a la membrana plasmática (McCune, et al., 2000). Estas observaciones confirman que este receptor tiene una elevada actividad constitutiva. En este trabajo observamos que el estímulo de TPA disminuye la concentración de calcio intracelular, lo que puede explicarse como consecuencia de una disminución en su actividad basal, independiente de ligando. El estudio de la fosforilación del receptor evidenció que el receptor está fosforilado en condiciones basales, y que esta fosforilación aumenta por acción de norepinefrina de manera dependiente de la dosis. Esto es acorde con la actividad constitutiva descrita.

Al comparar la fosforilación del receptor α_{1d} con la observada en los otros subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, vemos que su fosforilación basal es

mayor. Así, para detectar experimentalmente la fosforilación del subtipo α_{1b} se utilizan 3 veces más fósforo, y para ver fosforilado al α_{1a} se requieren 10 veces la concentración utilizada en el α_{1d} . Para esta interpretación es necesario considerar que las líneas celulares expresan cantidades equivalentes de cada subtipo (Vázquez-Prado & García-Sáinz, 1996).

Para los receptores α_1 -adrenérgicos, se han demostrado diferencias en la sensibilidad de cada subtipo a experimentar desensibilización homóloga inducida por norepinefrina o heteróloga por activación de la PKC por TPA. Así, en orden de sensibilidad $\alpha_{1d} \gg \alpha_{1b} > \alpha_{1a}$, lo cual correlaciona con el número de sitios potenciales de fosforilación por PKC. (Vázquez-Prado & García-Sáinz, 1996).

Si esta sensibilidad a la desensibilización dependiera del grado de fosforilación del receptor debería de reflejarse en EC_{50} obtenida de experimentos de dosis-respuesta, en donde se determina la relación entre concentración de NE o TPA y la fosforilación del receptor. La EC_{50} obtenida de los experimentos de dosis-respuesta a norepinefrina sobre la fosforilación del receptor α_{1d} , se comparó con los reportados para los otros subtipos. Entre los receptores α_{1a} ($EC_{50} \sim 500$ nM) y α_{1d} ($EC_{50} \sim 75$ nM) existe una correlación entre su sensibilidad a experimentar desensibilización homóloga y la concentración de la amina que se requiere para inducir la fosforilación del receptor. Esto no sucede para el subtipo α_{1b} ($EC_{50} \sim 25$ nM). En el caso de la fosforilación inducida por TPA, la EC_{50} para el subtipo α_{1a} -adrenérgico (~ 25 nM) es similar a la observada para el α_{1d} ($EC_{50} \sim 25$ nM), sin embargo para el subtipo α_{1b} parece no tener implicaciones funcionales (Vázquez-Prado, et al., 2000). Estos datos evidencian que no siempre es posible comparar directamente estos datos. No obstante que se han obtenido utilizando el mismo tipo celular, el nivel de expresión de cada subtipo no es exactamente el mismo y estas pequeñas variaciones pueden manifestarse en la desensibilización o en la fosforilación.

Las aportaciones hechas en este trabajo completan un panorama sobre la regulación de los receptores α_1 -adrenérgicos. Resultaría de gran interés el estudio de la regulación de los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en células que

los expresen de manera natural. Así, las variaciones e imprecisiones que se manifiestan en sistemas no naturales pueden ser superadas y tendremos un conocimiento más preciso de lo que ocurre en condiciones fisiológicas.

Conclusiones

En este trabajo hemos demostrado la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico en respuesta a su agonista norepinefrina y por activación farmacológica de la proteína cinasa C. Así como su importancia funcional.

Demostramos que el receptor α_{1d} -adrenérgico experimenta desensibilización homóloga y heteróloga.

Nuestros datos sugieren que la desensibilización inducida por norepinefrina es dependiente de fosforilación. Esta fosforilación inducida por la norepinefrina es insensible a inhibidores de la proteína cinasa C y de la fosfatidilinositol-3-cinasa, sugiriendo que depende de cinasas específicas para receptores acoplados a proteína G (GRK).

La activación farmacológica de la proteína cinasa C con TPA produce desensibilización heteróloga y aumenta la fosforilación del receptor, dado que esta fosforilación es sensible a inhibidores de la proteína cinasa C, puede tener importancia funcional en la regulación heteróloga de la actividad del receptor α_{1d} -adrenérgico.

También demostramos que el receptor α_{1d} -adrenérgico es regulado por activación de otros receptores como el receptor para ácido lisofosfatídico, que se expresa de manera endógena en estas células. Esto implica que existe regulación cruzada que involucra a los receptores adrenérgicos.

En general el aspecto más relevante es que la fosforilación es un mecanismo que regula la actividad de este subtipo de receptor adrenérgico. Participando tanto en la vía dependiente del agonista como en la regulación cruzada.

Referencias

- Anant, J.S. and Fung, B.K. (1992) *In vivo* farnesylation of rat rhodopsin kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **183** : 468-473.
- Awaji, T., Hirisawa, A., Kataoka, M., Shinoura, H., Nakayama, Y., Sugawara, T., Izumi, S-I. and Tsujimoto, G. (1998) Real-time optical monitoring of ligand-mediated internalization of α_{1b} -adrenoceptor with green fluorescent protein. *Mol Endocrinol.* **12** : 1099-1111.
- Baldwin, J. M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **6** :180-190.
- Benovic, J.L., Kühn, H., Weyland, I., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1987) Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor kinase : potential role of an analog of the retinal protein arrestin . *Proc Natl Acad Sci USA.* **84** :8879-8882.
- Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1986) β -adrenergic protein kinase : identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83** :2797-2801.
- Berry, S.A., Shah, M.C. Khan, N. and Roth B.L. (1996) Rapid agonist-induced internalization of the 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor occurs via the endosome pathway in vitro. *Mol Pharmacol.* **50** : 306-313.
- Blake, A.D., Mumford, R.A., Strout, H.V. Slater, E.G. and Strader, C.D. Synthetic segments of the mammalian beta AR are preferentially recognized by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. (1987) *Biochem Biophys Res Commun.* **147** :168-173.
- Bockaert, J. (1991). G proteins and G-protein-coupled receptor: Structure, functions and interactions. *Curr Opin Neurobiol.* **1** :32-42.

- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L.M.F., Benovic, J.L., Caron, M.G. and 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. *J Biol Chem.* **262** :3106-3113.
- Casas-González, P., Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J.A. (2000) Lysophosphatidic acid modulates α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation and function : roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol.* **57** :1027-1033.
- Chang, D.J. Chang, T.K., Yamanishi, S.S., Salazar, F.H.R., Kosaka, A.H., Khare, R., Bhakta, S., Jasper, J.R., Shieh, I-S., Lesnick, J.D., Ford, A.P.D.W., Daniels, D.V., Eglén, R.M. Clarke, D.E. Bach, C. and Chan, H.W. (1998) Molecular cloning, genomic characterization and expression of a novel human α_{1A} -adrenoceptors isoforms. *FEBS Lett.* **422** :279-283.
- Chatterjee, T.K., Sarkar, G., Sharma, R.V. and Fisher, R.A. (1995) Two novel variants of the rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor diverging within transmembrane domains 2 and 4 discriminate between cAMP and Ca^{2+} signaling pathways. *FASEB J.* **9** :A1411.
- Chuang, D-M., Kinnier, W.J., Farber, L. and Costa, E. (1980) A biochemical study of receptor internalization during β -adrenergic receptor desensitization in frog erythrocytes. *Mol Pharmacol.* **18** : 348-355.
- Chuang, T.T., Levine H. and DeBlasi, A. (1995) Phosphorylation and activation of β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem.* **270** : 18660-18665.
- Clapham, D.E. and Neer, E. J. (1993) New roles for G protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signaling. *Nature.* **365** :403-406.
- Cogé, F., Guenin, S-P., Renouard-Try, A., Rique, H., Ouvry, C., Fabry, N., Beauverger, P., Nicolas, J.P., Galizzi, J.P., Boutin, J.A. and Canet, E.

- (1999) Truncated isoforms inhibit [³H]prazosin binding and cellular trafficking of native human α_{1A} -adrenoceptors. *Biochem J.* **343** :231-239
- Cohen, G.B., Yang, T., Robinson, P.R. and Oprian, D.D. (1993) Constitutive activation of opsin : Influence of charge at. *Biochemistry.* **32** :6111-6115.
- Cotecchia, S., Scheer, A., Diviani, D., Fanelli, F. and De Benedetti, P-G. (1998) Molecular mechanisms involved in the activation and regulation of the α_1 -adrenergic receptor subtypes. *Il farmaco.* **53** :273-277.
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F. and Gutkind, J.S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature.* **369** :418-420.
- Corvera, S. and García-Sáinz J.A. (1984) Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic regulation of hepatocyte metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* **119** :1128-1133.
- Diviani, D., Lattion, A-L. and 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. *J Biol Chem.* **272** :28712-28719.
- Diviani, D., Lattion, A-L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., et al . (1996). Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_{1b} -adrenergic receptor. *J Biol Chem.* **271** :5049-5058.
- Eckhart, A.D., Duncan, S.J., Penn, R.B., Benovic, J.L., Lefkowitz, R. J. and Koch. W.J. (2000) Hybrid transgenic mice reveal in vivo specificity of G protein-coupled receptor kinases in the heart. *Circ Res.* **86** :43-50.
- Edvinsson, L., Ekbald, E., Hakanson, R., and Wahlestedt , C. Neuropeptide Y potentiates the effect of various vasoconstrictor agents on rabbit blood vessels. (1984) *Br J Pharmacol.* **83** :519-525.
- Fields, T.A. and Casey, P.J. (1995) Phosphorylation of G α by protein kinase C blocks interaction with the $\beta\gamma$ complex. *J Biol Chem.* **270** :23119-23125.

- Fonseca, M.I. Botton, D.C. and Brown, R.D. (1995) Agonist regulation of α_{1B} -adrenergic receptor subcellular distribution and function. *J Biol Chem.* **270** : 8902-8909.
- García-Sáinz, J.A., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado, J. and Romero-Avila, M.T. (1999) Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human α_{1B} -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* **385** :263-271.
- García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T. and Torres Márquez, M.E. (1995) Characterization of the human liver α_1 -adrenoceptors. Predominance of the α_{1A} subtype. *Eur J Pharmacol.* **289** : 81.
- García-Sáinz, J.A. and Torres-Padilla, M.E. (1999) Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonist and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1D} -adrenoceptors. *FEBS Lett.* **443** :277-281.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J. and Medina, L.C. (2000) α_1 -adrenoceptors : función and phosphorylation. *Eur J Pharmacol.* **389** : 1-12.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J. and Villalobos-Molina. (1999) α_1 -adrenoceptors : subtypes, signaling and roles in health and disease. *Archives of Medical Research.* **30** :449-458.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F. and Schultz G. (1996) Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **36** :429-459.
- Haga, K. and Haga, T. (1992) Activation by G protein $\beta\gamma$ subunits of agonist-or light. Dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors and rhodopsin. *J Biol Chem.* **267** : 2222-2227.
- Ham, H.E. and Gilchrist, A. (1996) Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **8** :189-196.
- Harden, T.K., Cotton, C.U., Waldo, G.L., Lutton, J.K. and Perkins, J.P. (1980). Catecholamine-induced alteration in sedimentation behavior of membrane bound β -adrenergic receptors. *Science.* **210** : 441-443.
- Hertel, C., Coulter, S.J. and Perkins J.P. (1985) A comparison of catecholamine-induced internalization of β -adrenergic receptors and receptor-mediated

- endocytosis of epidermal growth factor in human astrocytoma cells. *J Biol Chem.* **260** : 12547-12553.
- Hilgenfeld, R. (1995) Regulatory GTPases. *Curr Opin Struct Biol.* **5** :810-817.
- Ho, B.Y., Karschin, A., Branchek, T., Davidson, N. and Lester, H.A. (1992) The role of conserved aspartate and serine residues in ligand binding and function of 5-HT_{1A} receptor: A site-directed mutation study. *FEBS lett.* **312** :259-262.
- Hofmann, K.P., Jäger, S. and Ernst, O.P. (1995) Structure and function of activated rhodopsin. *Isr J Chem.*
- Hu, Z-W., Shi, X-Y., Lin, R.Z. and Hoffman B.B. (1999). Contrasting signaling pathways of α_{1A} - and α_{1B} -adrenergic receptor subtype activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras in transfected NIH3T3 cells. *Molecular Endocrinology.* **13** :3-14.
- Iacovelli, L., Franchetti, R., Grisolia, D. and De Blasi, A. (1999) Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, α_{1b} -adrenergic and A1 adenosine receptor-mediated responses. *Mol Pharmacol.* **56** :316-324.
- Ibarra, M., López-Guerrero, J.J. and Villalobos-Molina, R. (1998) Further evidence for the predominance of α_{1D} -adrenoceptors in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Rev Commun.* **10** :135.
- Keith, D.E., Murray, S.R., Zaki, P.A., Chu, P.C., Lissin, D.V., et al. (1996) Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem.* **271** : 19021-19024.
- Koch, W.J., Hawes, B.E., Inglese, J., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (1994) Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G $\beta\gamma$ -mediated signaling. *J Biol Chem.* **269** :6193-6197.
- Koenig, J.A. and Edwarson, J.M. (1996) Intracellular trafficking of the muscarinic acetylcholine receptor: importance of subtype and cell type. *Mol Pharmacol.* **49** : 315-359.

- Krupnic, J.G. and Benovic J.L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **28** :289-319.
- Kunapuli, P., Gurevich, V.V. and Benovic, J.L. (1994) Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J Biol Chem.* **269** : 10209-10212.
- LaMorte, V.J., Thorburn, J., Absher, D., Spiegel, A., Brown, J.H., Chien, K.R., Feramisco, J.R. and Knowlton, K.U. (1994) Gq- and ras dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following α_1 -adrenergic stimulation. *J Biol Chem.* **269** : 13490 :13496.
- Lattion, A-L., Diviani, D. and Cotecchia, S. (1994) Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the α_{1b} -adrenergic receptor. *J Biol Chem.* **269** : 22887-22893.
- La Vallie, E.R., Smith, D.B. and Riggs, P. (1997) in Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition. Editors: Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Sedman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. pp. 16.20-16.21. Willey, New York.
- Llahi, S. and Fain, J. (1992) α_1 -Receptor-mediated activation of phospholipase D in rat cerebral cortex. *J Biol Chem.* **267** :3679.
- Leeb-Lundberg, L.M.F., Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M.G. and 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. *J Biol Chem.* **262** : 3098-3105.
- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samana, P. and Costa T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci.* **14** :303-307.

- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J. and Clapham, D.E. (1987) The β subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature*. **325** :321.
- Lohse, M. (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta*. **1179** :171-188
- Lohse, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S. and Codina, J.(1992) Receptor -specific desensitization with purified proteins: kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β 2-adrenergic and rhodopsin systems. *J Biol Chem*. **267**: 8558-8564.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1990) Multiple pathways of rapid β 2-adrenergic receptor desensitization delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem*. **265**: 3202-3209.
- Lohse, M.J. Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R. J. (1990) β -arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science*. **248**: 1547-1550.
- Lomasney, J.W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W.Y., Schwinn, D.A., Yang-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1A} -adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem*. **266**: 6365-6369.
- Loudon, R.P. and Benovic, J.L.: (1997) Regulation of the G-protein coupled receptor kinase GRK6: altered activity of palmitoylation-deficient and isoprenylated forms of GRK6. *J Biol Chem*. **272**: 27422-27427.
- McCune, D.F., Edelman, S.E. Olges, J.R., Post, G.R., Waldrop, B.A., Waugh, D.J.J., Perez, D.M. and Piascik, M.T. (2000) Regulation of the cellular localization and signaling properties of the α_{1b} - and α_{1d} -adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol Pharmacol*. **57** :659-666.
- Mhaouty-Kodja, S., Barak, L.S., Scheer, A., Abuin, L., Diviani, D., Caron, M.G. and Cotecchia, S. (1999) Constitutively active α_{1b} -adrenergic receptor

- mutants display different phosphorylation and internalization features. *Mol Pharmacol.* **55** :339-347.
- Michel, M.C., Kenny, B. and Schwinn, D.A. (1995) Classification of α_1 -adrenoceptor subtypes. *Naunym-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **352** :1-10.
- Milano, C.A., Dolber, P.C., Rockman, H.A., Bond, R.A., Venable, M.E., Allen, L.F. and Lefkowitz, R.J. (1994) Myocardial expression of a constitutively active α_{1b} -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91** : 10109-10113.
- Minneman, K.P. (1988). α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. *Pharmacol Rev.***40** : 87-119.
- Moyers, J.S., Linder, M.E., Shannon, J.D. and Parsons, S.J. (1995) Identification of the in vitro phosphorylation sites on Gs α mediated by pp60^{c-sis}. *Biochem J.* **305** : 411-417.
- Muramatsu, I., Ohmura, T., Kigoshi, S., Hashimoto, S. and Oshita, M. (1990) Pharmacological subclassification of α_1 -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol.* **99** :197-201.
- Nantel, F., Bonin, H., Emorine, L.J., Zilberfarb, V., Strosberg, A.D., Bouvier, M. and Marullo, S. (1993) The human β_3 -adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol Pharmacol.* **43** : 548-555.
- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins : Organizers of transmembrane signals. *Cell.* **80** :249-257.
- Neer, E.J. (1994) G proteins : Critical points for transmembrane signals. *Protein Sci.* **3** :3-14.
- Palacios, J.M., Garbarg, M., Barbin, G. and Schwartz, J.C. (1978) Pharmacological characterization of histamine receptors mediating the stimulation of cyclic AMP accumulation in slices from guinea-pig hippocampus. *Mol Pharmacol.* **14** :971-982.
- Parma, J., Duprez, L., Van Sande, J., Cochaux, P., Gervy, C., Mockel, J., Dumont, J. And Vassart, G. (1993) Somatic mutations in the thyrotropin

- receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature*. **365** :649-651.
- Perez, D.M., DeYoung, M.B. and Graham, R.M. (1993). Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol*. **44** :784-795.
- Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, V.V., DeKozak, et al. (1985) Retinal S antigen identified as the 48 K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science*. **228** :891-893.
- Piasecki, M. T., Hrometz, S.L., Edelman, S.E., Guarino, R.D., Hadley, R.W. and Brown, R.D. (1997) Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction : analysis with selective ligands and antisense oligonucleotide. *J Pharmacol Exp Ther*. **283** :221-226.
- Pippig, S., Andexinger, S. and Lohse, M.J. (1995) Sequestration and recycling of β 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol*. **47** : 666-676.
- Pitcher, J.A., Lohse, M.J., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1992) Desensitization of the isolated β 2-adrenergic receptor by β 2-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry*. **31** :3193-3197.
- Pitcher, J.A., Payne, E.S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A.A. and Lefkowitz, R. J. (1995). The G-protein-coupled receptor phosphatase : a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* . **92** : 8343-8347.
- Pittman, R.N., Molinoff, P.B. (1980) Interactions of agonists and antagonists with β -adrenergic receptors in intact cells. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*. **6** :421-435.
- Premont, R.T., Inglese, J. and Lefkowitz, R.J.(1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J*. **9** :175-182.

- Price, D.T., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Berkowitz, D. and Schwinn, D.A. (1994) Localization of mRNA for three distinct α_1 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human adrenergic physiology. *Mol Pharmacol.* **45** :703.
- Rokosh, D.G., Bailey, B.A., Stewart, A.F., Karns, L.R., Long, C.S. and Simpson, P.C. (1994) Distribution of alpha 1C-adrenergic receptor mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with alpha 1B and alpha 1D. *Biochem Biophys Res Commun.* **200** : 1177-1184.
- Samana, P., Cotecchia, S., Costa, T. and Lefkowitz, R.J. (1993) A mutation-induced activated state of β_2 -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem.* **268** :4625-4636.
- Savarese, T.M., Wang, C-D. and Fraser, C.M. (1992) Site-directed mutagenesis of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor. Role of conserved cysteines in receptor function. *J Biol Chem.* **267** :11439-11448.
- Selbie, L.A. and Hill, S.J. (1998) G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci.* **19** :87-93.
- Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A. and Neer E.J. (1992) Specificity of G protein β and γ subunit interactions. *J Biol Chem* **267** :13807-13813
- Schertler, G.F.X., Villa, C. and Henderson, R. (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature.* **362** :770-772.
- Schwinn, D.A. and Kwatra, M.M. (1998) Expression and regulation of α_1 -adrenergic receptors in human tissues. In: *Catecholamines bridging basic science with clinical medicine*. Advances in pharmacology Vol: 42. Editors: Goldstein D.S., Eisenhofer, G. and McCarty R. pp: 390-393. Academic Press. USA.
- Simpson, P. (1983) Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an α_1 -adrenergic response. *J Clin Invest.* **72** : 732.
- Skiva, N.P., Bae, H. and Hamm, H.E. (1996) Mapping of effector binding sites of transducin α -subunit using *G α t/G α i1* chimeras.. **271** :413-424.

- Smith, D.B. and Corcoran, L.M. (1994) In: *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. (editors).
- Smrcka, A.V. and Sternweis, P.C. (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem* . **268** :9667-9674.
- Stoffel, R.H., Randall, R.R., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. and Inglese, J. (1994) Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6 : lipid modification diversity in the GRK family. *J Biol Chem*. **269** : 27791-27794.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., et al. (1994) Structure and function of G-protein coupled receptors. *Ann Rev Biochem* . **63** :101-32.
- Strader, C.D., Sigal, I.S., Candelore, M.R., et al. (1988) Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J Biol Chem*. **263** :10267-10271.
- Strader, C.D., Gaffney, T.G. and Sugg, E.e. (1991) Allele-specific activation of genetically engineered receptors. *J Biol Chem*. **266** :5-8.
- Strader, C.D., Candelore, M.R., Hill, W.S., et al. (1989) Identification of two serine residues involved in agonist activation of the β -adrenergic receptor. *J Biol Chem*. **264** :13572-13578.
- Tang, W-J. and Gilman, A.G. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science*. **254** :1500-1503.
- Thorburn, J. and Thorburn, A. (1994) The tyrosine kinase inhibitor, genistein, prevents a-adrenergic-induced cardiac muscle cell hypertrophy by inhibiting activation of the Ras-MAP kinase signaling pathway. *Biochem Biophys Res Comm*. **202** : 1586 -1591.
- Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H. and Nagao, T. (1994) Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. *J Biol Chem*. **269** : 32522-32527.

- Villalobos-Molina, R. and Ibarra, M. (1996) α_1 -Adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the α_{1D} or α_{1A} subtypes. *Eur J Pharmacol.* **298** :257.
- Vázquez-Prado, J. and 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** : 17-22
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero, M.T., González-Espinosa, C. and García-Sáinz, J.A. (2000) Norepinephrine and phorbol ester-induced phosphorylation of α_{1B} -adrenergic receptors. *J Biol Chem.* **275** :6553-6559.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C. and García-Sáinz, J.A. (1997) Activation of endothelin ET_A receptors induce phosphorylation of α_{1B} -adrenoceptors in rat-1 fibroblast. *J Biol Chem.* **272** :27330-27337.
- Waldo, G.L., Northup, J.K., Perkins, J.P. and Herden, T.K. (1983) Characterization of an altered membrane form of the β -adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization. *J Biol Chem.* **258** : 13900-13908.
- Wakshull, E., Hertel, C., O'Keefe E.J. and Perkins, J.P. (1985) Cellular redistribution of β -adrenergic receptors in a human astrocytoma cell line : a comparison with the epidermal growth factor receptor in murine fibroblast. *J Cell Biol.* **29** :127-141.
- Watson, S. and Arkininstall, S. (1994) The G-protein linked receptor. Facts Book Series. Academic Press LTD. pp:40-41.
- Watson, A.J., Katz, A. and Simon, M.I. (1994) A fifth member of the mammalian G-protein subunit family. *J Biol Chem.* **269** :22150-22156.
- Wedegaertner, P.B., Wilson P.T. and Bourne, H.R.(1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. **270** : 503-506
- Wess, J., Nanavati, S., Vogel, Z. And Maggio R. (1993) Functional role of proline and tryptophan residues highly conserved among G protein-coupled receptors studied by mutational analysis of the m3 muscarinic receptor. *EMBO J.* **12** :331-338.