

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

MULTIFUNCIONALIDAD DE LA ADENOSINA DESAMINASA
DE LA SUPERFICIE CELULAR Y DE SUS PROTEÍNAS DE
UNIÓN

SILVIA GINÉS PADRÓS

CAPÍTULO 2.

LOS RECEPTORES A₁ DE ADENOSINA Y D₁ DE DOPAMINA FORMAN HETEROMEROS FUNCIONALES. DISTRIBUCIÓN DE LA ADA DE SUPERFICIE EN ESTOS COMPLEJOS RECEPTOR-RECEPTOR

La adenosina es un nucleósido endógeno que funciona como neuromodulador en el sistema nervioso central. Sus acciones vienen mediadas por cuatro subtipos distintos de receptores de adenosina: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃ (Fredholm et al, 1994). Los receptores A₁ y A_{2A} son la principal diana de los efectos conductuales que se producen en el animal de experimentación tras la administración de fármacos agonistas y antagonistas adenosínicos (Ferré et al, 1992, 1997). Estos dos receptores localizados en los ganglios basales y, en particular en el estriado, son los responsables de los efectos depresores motrices de agonistas adenosínicos y estimulantes motrices de antagonistas adenosínicos (Ferre et al, 1992, 1997). La mayoría de los receptores adenosínicos estriatales, se localizan en la neurona GABAérgica espinosa mediana, una neurona eferente que constituye más del noventa por ciento de la población neuronal estriatal (Schiffmann et al, 1991; Rivkees et al, 1995). Existen dos tipos de neuronas GABAérgicas eferentes estriatales, las neuronas estriopalidales, caracterizadas por la presencia de receptores dopaminérgicos del subtipo D₂, y las neuronas estrionígrico-estriopedunculares, que contienen receptores dopaminérgicos D₁ (Ferre et al, 1997). Ambos tipos neuronales contienen receptores de adenosina A₁ mientras que los receptores A_{2A} se encuentran solamente en las neuronas estriopalidales (Schiffmann et al, 1991; Ferre et al, 1996). Es decir, los receptores A_{2A} sólo codistribuyen con los receptores dopaminérgicos del tipo D₂ mientras que los receptores de adenosina A₁ codistribuyen tanto con los receptores D₂ como con los D₁. Se han descrito efectos antagonistas entre los receptores de adenosina y los de dopamina en el sistema nervioso central y especialmente en los ganglios basales (Ferré et al, 1997; Fuxe et al, 1998). En particular, los receptores A_{2A} modulan de forma antagónica los efectos producidos por la estimulación de los receptores D₂ mientras que los receptores A₁ modulan de forma antagonista al receptor D₁ de dopamina (Ferré et al, 1992, 1997). El antagonismo es evidente en preparaciones de membrana de células que coexpresan ambos receptores y en estriado de rata, en los que la activación del receptor A₁ de adenosina, disminuye la proporción de receptores D₁ de dopamina en estado de alta

afinidad pero sin variar los valores de las constantes de disociación (Ferré et al, 1994).

Hasta hace poco, la estequiometría receptor-proteína G-efector para los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) se consideraba que era 1:1:1, sin embargo, estudios de cooperatividad en la unión de agonistas al receptor (*binding*), han sugerido la posibilidad de oligomerización de proteínas G y sus receptores asociados. En 1995, nuestro grupo de investigación demostró por primera vez en cerebro de rata, que un miembro de la superfamilia GPCR, el receptor A_1 de adenosina, existe como dímero y que éste puede multimerizar en respuesta a ligandos (Ciruela et al, 1995). Desde entonces se han descrito dimerizaciones y multimerizaciones para varios GPCR, incluidos los receptores D_1 de dopamina que existen como especies de alto peso molecular consistente con la formación de dímeros y oligómeros de los polipéptidos. En este sentido, estudios recientes han demostrado que el receptor $GABA_B R1$ requiere la coexpresión de otro polipéptido homólogo, el receptor $GABA_B R2$, para ser conducido a la membrana y señalizar de forma eficiente. No sólo los receptores $GABA_B$ requieren la expresión del heterodímero $GABA_B R1/ GABA_B R2$ en la superficie neuronal para ser funcionales, Jordan and Devil 1998, han demostrado también que dos receptores opioides funcionales, κ y δ pueden heterodimerizar, lo que conlleva a un cambio en la farmacología de los receptores individuales y potencia la señal de transducción. Sin embargo, la heteromerización entre receptores pertenecientes a dos subfamilias distintas de receptores acoplados a proteínas G no ha sido demostrada. En este trabajo englobado en esta Tesis Doctoral, hemos demostrado mediante coimmunoprecipitación la heteromerización funcional del receptor D_1 de dopamina y el receptor A_1 de adenosina. La distribución (analizada por inmunocitoquímica y microscopía confocal) y la función (medida como acumulación de AMPc inducida por estimulación del $D_1 R$) de los heterómeros $A_1 R/D_1 R$, se modula de forma diferencial por exposición a los agonistas adenosínicos y/o dopaminérgicos. La interacción funcional entre proteínas de la membrana plasmática se ha demostrado en otros sistemas que también implican el receptor A_1 de adenosina. Nuestro grupo de investigación en la década de los 90 ha demostrado la interacción molecular y funcional entre la adenosina desaminasa de la superficie celular y el propio receptor A_1 . La adenosina desaminasa es un enzima que participa en el metabolismo purínico degradando la adenosina o la 2' desoxiadenosina a inosina o 2' desoxiinosina respectivamente (Fredholm 1995) siendo un enzima que se localiza tanto en el citosol como en la membrana plasmática. Sin embargo, la adenosina desaminasa

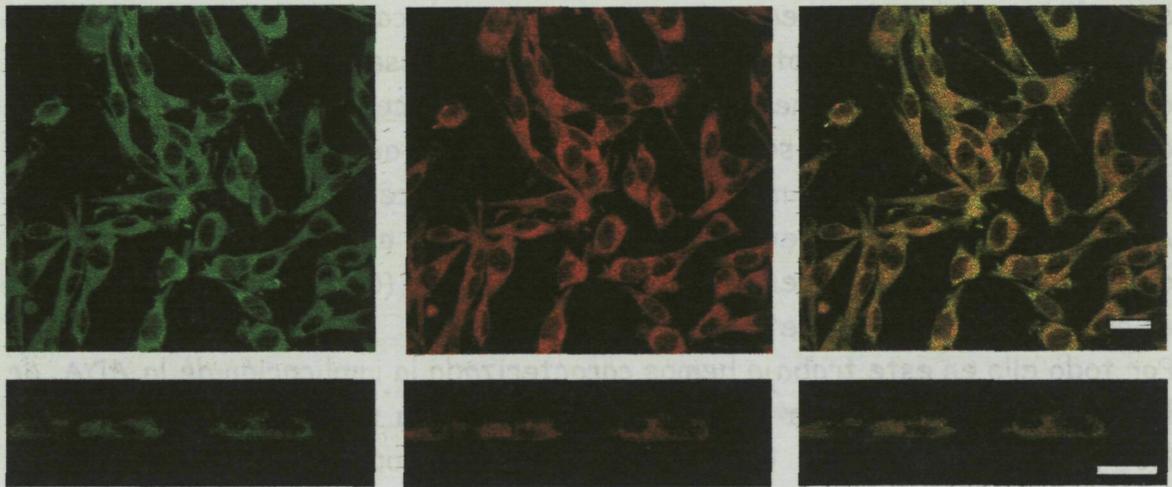
en su estructura primaria no presenta dominios que le permitan anclarse a la superficie celular. Ya hemos mencionado en el capítulo 1. 3. 3 de la Introducción que el receptor A_1 de adenosina representa una de las moléculas de unión de la ADA a la membrana plasmática. El receptor A_1 de adenosina, sin embargo, no funciona tan sólo como una molécula de anclaje de la ADA sino que además ésta es capaz de modular la función del receptor de adenosina. Así la ADA es necesaria para identificar el estado de alta afinidad del receptor A_1 y acelera el proceso de desensibilización del receptor (Ciruela et al, 1996, Saura et al, 1996, 1998, Franco et al, 1997)

Por todo ello en este trabajo hemos caracterizado la implicación de la ADA de la superficie celular en la interacción antagonista a nivel de membrana entre los receptores A_1 de adenosina y D_1 de dopamina en fibroblastos cotransfectados con el cDNA de ambos receptores. La presencia en estas células de la ecto-ADA y su distribución tras la incubación con agonistas adenosínicos o dopaminérgicos se ha puesto de manifiesto mediante técnicas inmunocitoquímicas y análisis por microscopía confocal.

1- Distribución del receptor A_1 de adenosina y del receptor D_1 de dopamina en células cotransfectadas A_1R/D_1R .

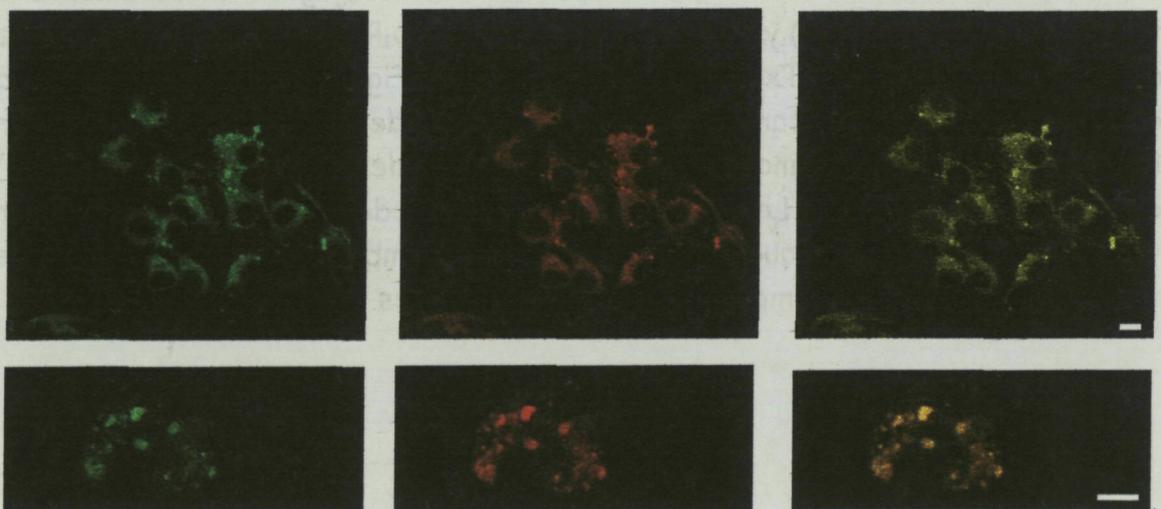
La distribución del A_1R y del D_1R en fibroblastos de rata doblemente transfectados con el cDNA humano de ambos receptores, se ha estudiado mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal. Las células se tratan (Materiales y Métodos) para su posterior análisis por microscopía confocal marcándose con un anticuerpo anti- A_1R conjugado directamente a fluoresceína (PC21-FITC) y con un anticuerpo anti- D_1R conjugado directamente a texas red (anti- D_1R -Tx). En células control (Figura 1A) se aprecia una distribución homogénea tanto del receptor A_1 de adenosina como del receptor D_1 de dopamina observándose un elevado grado de colocalización (amarillo) entre ambos receptores. La colocalización, como puede apreciarse en la sección vertical (Figura 1A), no queda restringida a la membrana plasmática sino que también se extiende a compartimentos intracelulares.

Figura 1A



Con el fin de estudiar si los agonistas (R-PIA y SKF-38393) pueden modular la distribución de ambos receptores, las células A_1R/D_1R se incuban durante 1h a $37^\circ C$ con el agonista adenosínico R-PIA, con el agonista dopaminérgico SKF-38393 o con ambos agonistas simultáneamente antes de fijarlas e incubarlas con el anticuerpo PC21-FITC y el anticuerpo anti- D_1R -Tx. El tratamiento con R-PIA (Figura 1B) provoca una marcada redistribución de ambos receptores. El agonista R-PIA, es capaz de agregar (*clustering*) el receptor A_1 de una forma similar a la anteriormente descrita por otros autores en sistemas celulares distintos, lo más sorprendente es sin duda, la capacidad de este agonista adenosínico para agregar el receptor D_1 de dopamina. El grado de colocalización en los agregados (*clusters*) generados tras la incubación con R-PIA es muy elevado, casi de un 100%.

Figura 1B



El tratamiento de las células A₁R/D₁R con el agonista dopaminérgico SKF-38393, tan sólo modifica la distribución del receptor D₁ de dopamina. Como puede apreciarse en la Figura 1C, el receptor A₁ de adenosina muestra un patrón de distribución idéntico al observado en las células control mientras que el receptor de dopamina aparece claramente agregado.

Figura 1C

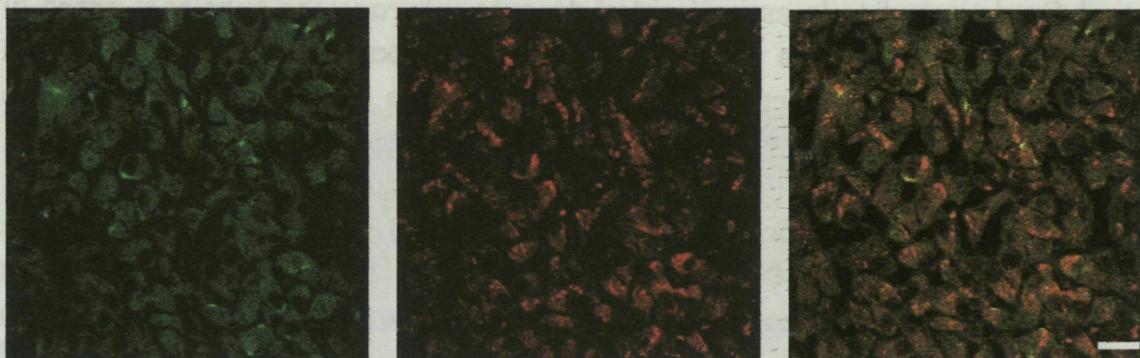


Figura 1D



Figura 1. Distribución del receptor A₁ de adenosina y del receptor D₁ de dopamina en células A₁R/D₁R. Las células se han incubado durante 1h en medio de cultivo en ausencia (A), presencia de R-PIA 100 nM (B), presencia de SKF-38393 10 μM (C) o en presencia de ambos agonistas simultáneamente (D). Las células se han procesado para la inmunocitoquímica como se describe en materiales y métodos, marcándose con un anticuerpo anti-A₁R conjugado a fluoresceína (verde) y un anticuerpo anti-D₁ conjugado a Texas red (rojo). Las muestras se han analizado por microscopía confocal. La colocalización se muestra en amarillo. En la figura A y B el panel superior corresponde a una sección media horizontal de las células, mientras que el panel inferior corresponde a una sección vertical. Barra de escala 10 μm.

Estos resultados sugieren que los agonistas del receptor A_1 de adenosina son capaces de modular no únicamente su propio receptor sino al receptor D_1 de dopamina provocando la agregación de ambos receptores. Cuando las células se incuban simultáneamente con ambos agonistas (R-PIA y SKF-38393) no se produce agregación ni del receptor A_1 de adenosina ni del receptor D_1 de dopamina. Ambos receptores aparecen distribuidos según el patrón observado en las células control (Figura 1D).

Con el fin de estudiar la especificidad de esta interacción funcional entre el receptor A_1 de adenosina y el receptor D_1 de dopamina se ha estudiado la distribución de los receptores A_1 de adenosina y D_2 de dopamina en fibroblastos doblemente transfectados con el cDNA de ambos receptores. Como se observa en la Figura 2A, en células control, ambos receptores no codistribuyen. El grado de colocalización (amarillo) entre el receptor A_1 de adenosina y el receptor D_2 de dopamina es bajo pudiéndose distinguir las zonas de expresión del receptor de dopamina respecto las zonas de expresión del receptor de adenosina. El tratamiento de las células A_1R/D_2R con el agonista R-PIA provoca la agregación del receptor A_1 de adenosina sin modificar la distribución celular del receptor D_2 de dopamina (Figura 2B). El agonista adenosínico tiene tan sólo la capacidad de redistribuir el receptor A_1 de adenosina. Estos datos sugieren que no existe una interacción funcional entre los receptores A_1 de adenosina y los receptores D_2 de dopamina y que por tanto la modulación del agonista R-PIA es específica para la pareja A_1R/D_1R .

Figura 2A

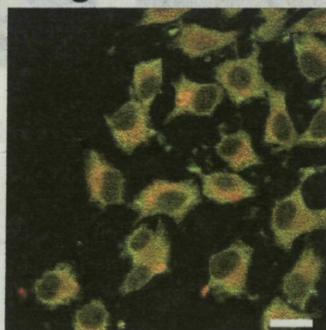


Figura 2B

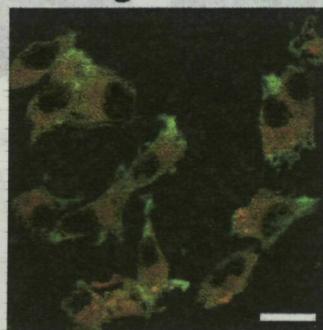
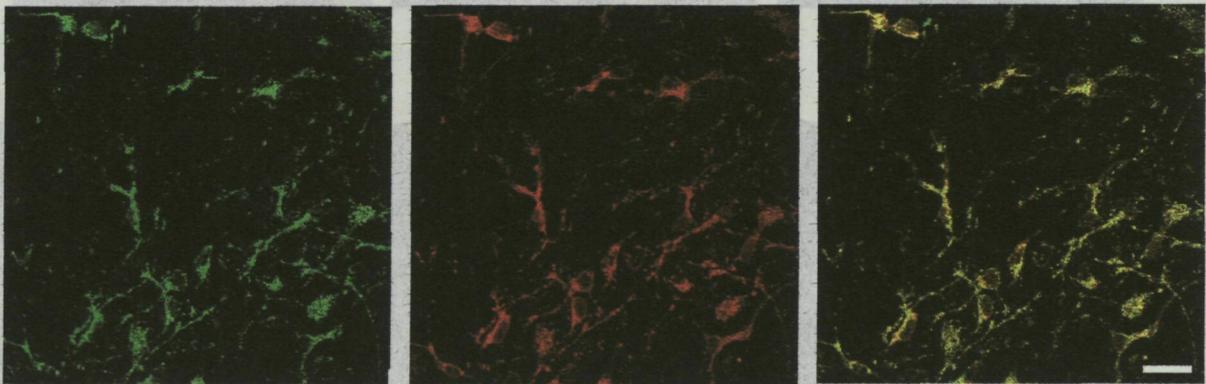


Figura 2. Distribución del receptor A_1 de adenosina y del receptor D_2 de dopamina en células A_1R/D_2R . Las células se han incubado durante 1h en medio de cultivo en ausencia (A) o presencia de R-PIA 100 nM. Las células se han procesado para la inmunocitoquímica como se describe en materiales y métodos, marcándose con un anticuerpo anti- A_1R conjugado a fluoresceína (verde) y un anticuerpo anti- D_2 conjugado a rodamina (rojo). Las muestras se han analizado por microscopía confocal. Barra de escala 10 μ m.

2-Distribución del receptor A_1 de adenosina y del receptor D_1 de dopamina en neuronas corticales.

Con el fin de estudiar las implicaciones fisiológicas de los resultados obtenidos en las células A_1R/D_1R , se ha estudiado la codistribución del receptor A_1 de adenosina y el receptor D_1 de dopamina en cultivos primarios de neuronas de cortex cerebral de rata. En primer lugar, se confirma la expresión de ambos receptores en el cultivo neuronal (Figura 3A).

Figura 3A



La localización del A_1R y D_1R es uniforme y a nivel tanto del cuerpo neuronal como de las dendritas. Esta distribución es consistente con trabajos previos que han identificado los receptores D_1 y A_1 en dendritas y espinas, en el cuerpo neuronal, y principalmente, a un nivel extrasináptico (Caille et al, 1996; Rivkees et al, 1995). El nivel de colocalización entre ambos receptores es elevado y similar al que se ha encontrado en las células cotransfectadas. Como en el caso de las células A_1R/D_1R también en neuronas se ha analizado el efecto de los ligandos en la distribución y colocalización de los receptores. El agonista R-PIA reproduce los efectos ya observados en células cotransfectadas (Figura 3B). El tratamiento con el agonista adenosínico provoca la agregación del propio receptor A_1 de adenosina así como del receptor D_1 de dopamina. La agregación es muy evidente en el cuerpo neuronal, desapareciendo prácticamente por completo el marcaje en dendritas. El grado de colocalización en los agregados tras la incubación con R-PIA es muy alto.

Figura 3B

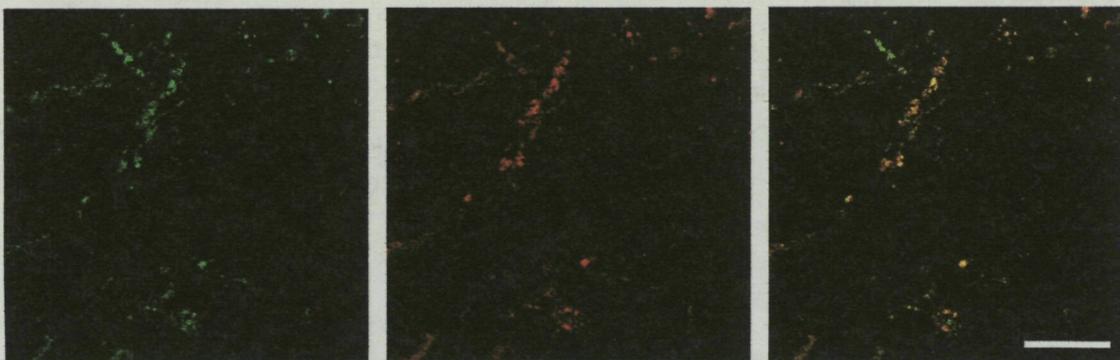
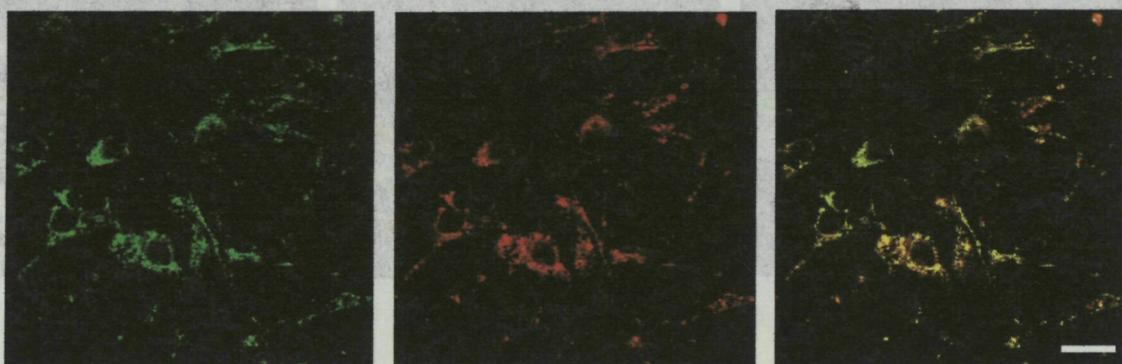


Figura 3C



En contraste con lo que observamos en células cotransfectadas, el efecto del SKF-38393 en neuronas es similar al observado por R-PIA, esto es, ambos receptores se agregan (Figura 1C). Este resultado puede reflejar cambios en la cantidad relativa de cada uno de los tipos de receptor en los complejos A₁R/D₁R en neuronas respecto células cotransfectadas. En neuronas el tratamiento simultáneo con ambos agonistas reproduce los resultados obtenidos en células A₁R/D₁R (Figura 1D). La presencia de ambos agonistas induce la pérdida de agregación entre el receptor A₁ de adenosina y el receptor D₁ de dopamina.

También en neuronas se ha estudiado la especificidad de la interacción A₁R/D₁R. Mediante inmunofluorescencia y utilizando un anticuerpo específico anti-D₂ (Materiales y métodos), se ha estudiado la distribución del receptor A₁ de adenosina y el receptor D₂ de dopamina en neuronas corticales. En células control (Figura 4A), ambos receptores se distribuyen homogéneamente en la superficie neuronal, existiendo cierto grado de codistribución principalmente

en el cuerpo neuronal. Tras el tratamiento con R-PIA (Figura 4B), el marcaje del receptor A_1 de adenosina en la superficie de las neuronas corticales disminuye notablemente respecto a las células control. Este resultado, sugiere que tras la incubación de las neuronas con el agonista R-PIA, el receptor A_1 de adenosina se internaliza disminuyendo el marcaje en la superficie celular. Ningún cambio en la intensidad del marcaje ni en la distribución en la superficie neuronal se aprecia para el receptor D_2 de dopamina.

Figura 4A

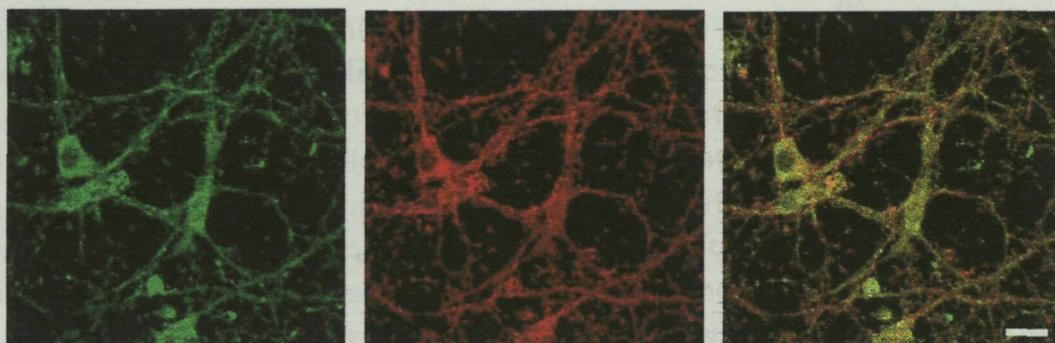


Figura 4B

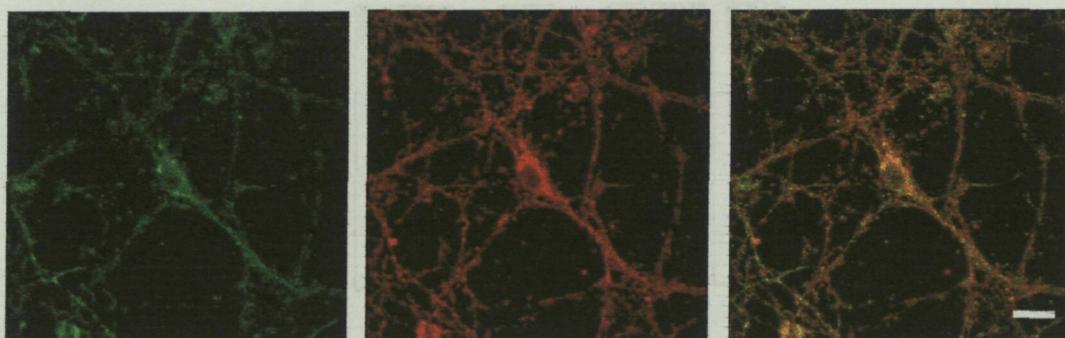


Figura 4. Distribución del receptor A_1 de adenosina y del receptor D_2 de dopamina en cultivos primarios de neuronas corticales de rata. Las células se incuban 1 h en medio de cultivo en ausencia (A) o presencia (B) de R-PIA 100 nM. Las células se fijan y marcan con un anticuerpo anti-A1R conjugado a fluoresceína (verde) y un anticuerpo anti-D2 conjugado con rodamina (rojo). Las muestras se analizan por microscopía confocal. La colocalización se muestra en amarillo. Barra de escala 10 μ M.

4-Coinmunoprecipitación de los receptores A_1 de adenosina y D_1 de dopamina.

Los estudios por microscopía confocal, nos han aportado datos de la distribución de los receptores de adenosina y dopamina bien en células cotransfectadas bien en neuronas de cortex cerebral de rata, sugiriendo que la interacción funcional entre ambos receptores puede ser debida a una interacción molecular entre ellos. La existencia de heterómeros A_1/D_1 se ha estudiado mediante ensayos de coinmunoprecipitación. Las células A_1R/D_1R se han incubado con el agonista adenosínico R-PIA o el agonista dopaminérgico SKF-38393 antes de obtener por ultracentrifugación las membranas celulares. Las membranas se solubilizan y el solubilizado se incuba con un anticuerpo anti- A_1R , un anticuerpo anti- D_1R , un anticuerpo anti- D_2R , o un anticuerpo irrelevante acoplados todos ellos directamente a proteína A-Sepharose. Los inmunoprecipitados finalmente se resuelven por electroforesis SDS-PAGE y western-blot (Materiales y métodos).

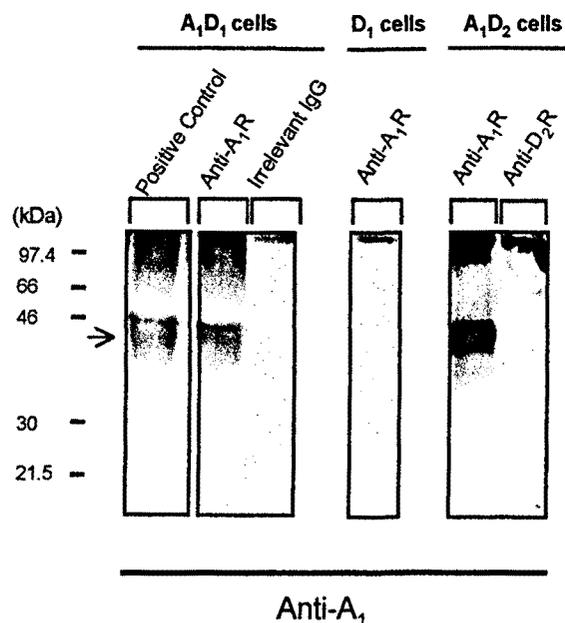


Figura 5A. Coinmunoprecipitación del receptor A_1 de adenosina y del receptor D_1 de dopamina en las células A_1R/D_1R . Las membranas se han obtenido y procesado para la inmunoprecipitación como se describe en materiales y métodos. Se han utilizado como anticuerpos inmunoprecipitantes un anticuerpo anti- A_1R (PC11), un anticuerpo anti- D_2 o un anticuerpo irrelevante. Los lisados (control positivo) y los inmunoprecipitados se han resuelto por electroforesis (SDS-PAGE) y Western Blot. En la figura se muestra el revelado de las muestras con el anticuerpo anti- A_1R .

En células A_1R/D_1R , el anticuerpo anti- A_1R es capaz de rendir una banda de 44 kDa correspondiente al propio receptor A_1 de adenosina inmunoprecipitado (Figura 5A) y de coinmunoprecipitar una banda de 46 kDa detectada por el anticuerpo anti- D_1R humano (Figura 5B). Esta banda correspondiente al receptor D_1 coinmunoprecipitado no aparece cuando la inmunoprecipitación se lleva a cabo con un anticuerpo irrelevante o cuando se han utilizado solubles de membrana provenientes de células transfectadas tan sólo con el cDNA humano del receptor D_1 (Figura 5B) lo que demuestra el carácter específico de esta coinmunoprecipitación. Tras el tratamiento de las células con R-PIA, el anticuerpo anti- A_1R sigue siendo capaz de coinmunoprecipitar el receptor D_1 de dopamina, aunque la banda resulta de menor intensidad que la obtenida en células control (Figura 5B). El tratamiento con SKF-38393 impide la coinmunoprecipitación del receptor D_1 de dopamina no observándose ninguna banda tras el revelado con el anticuerpo anti- D_1 (Figura 5B).

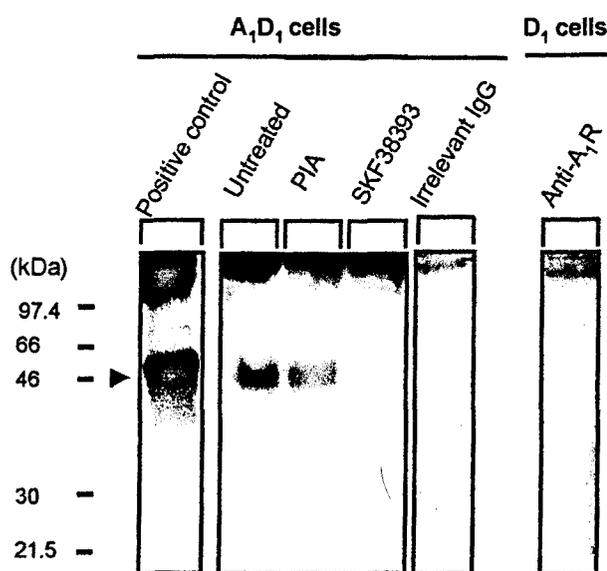


Figura 5B. Coinmunoprecipitación del receptor A_1 de adenosina y del receptor D_1 de dopamina en las células A_1R/D_1R . Las células se han incubado durante 1h en medio de cultivo en ausencia o en presencia de R-PIA 100 nM o SKF-38393 10 μ M, Las membranas se han obtenido y procesado para la inmunoprecipitación como se describe en materiales y métodos. Se han utilizado como anticuerpos inmunoprecipitantes un anticuerpo anti- A_1R (PC11) o un anticuerpo irrelevante. Los lisados (control positivo) y los inmunoprecipitados se han resuelto por electroforesis (SDS-PAGE) y Western Blot. En la figura se muestra el revelado de las muestras con el anticuerpo anti- D_1R .

Todos estos datos nos sugieren que el receptor A_1 de adenosina y el receptor D_1 de dopamina forman heterómeros funcionales, sin embargo podría pensarse que esta interacción funcional es general entre los receptores de adenosina y dopamina no existiendo ninguna especificidad respecto al subtipo de receptor que interacciona. Por ello decidimos estudiar si el receptor A_1 de adenosina es también capaz de interactuar molecularmente con el receptor D_2 de dopamina, es decir, si la formación de heterómeros funcionales es exclusiva de la pareja A_1R/D_1R . Para ello se obtuvieron membranas de células doblemente transfectadas con el cDNA de los receptores A_1 de adenosina y D_2 de dopamina (células A_1R/D_2R), se solubilizaron y se inmunoprecipitaron (Materiales y Métodos) con un anticuerpo anti- A_1R o un anticuerpo anti- D_2R ambos conjugados directamente a proteína A Sepharose. En estas células, ni el anticuerpo anti- A_1R es capaz de inmunoprecipitar el receptor D_2 de dopamina ni el anticuerpo anti- D_2R es capaz de inmunoprecipitar una banda correspondiente al receptor A_1 de adenosina (Figura 5A y Figura 5C) demostrando una vez más el carácter específico de la interacción A_1R/D_1R .

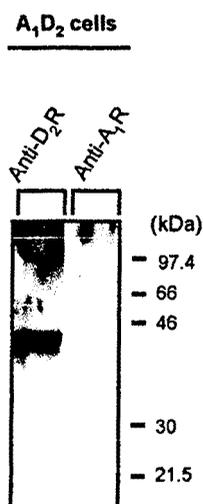


Figura 5C. Coinmunoprecipitación del receptor A_1 de adenosina y del receptor D_2 de dopamina en las células A_1R/D_2R . Las membranas se han obtenido y procesado para la inmunoprecipitación como se describe en materiales y métodos. Se han utilizado como anticuerpos inmunoprecipitantes un anticuerpo anti- A_1R (PC11) o un anticuerpo anti- D_2R . Los inmunoprecipitados se han resuelto por electroforesis (SDS-PAGE) y Western Blot. En la figura se muestra el revelado de las muestras con el anticuerpo anti- D_2R .

4. Determinación de AMPc.

Con el objetivo de estudiar la funcionalidad de los heterómeros A₁R/D₁R, se ha analizado como agonistas adenosínicos y dopaminérgicos pueden modular la acumulación de AMPc tras la estimulación por SKF-38393 del receptor D₁ de dopamina en células A₁R/D₁R.

Las células A₁R/D₁R se han tratado 30 min, 60 min o 120 min con el agonista dopaminérgico SKF-38393 (10 μM) y/o con el agonista adenosínico R-PIA (100 nM). Tras un lavado a 4 °C con medio de cultivo que contiene el inhibidor de fosfodiesterasas 3-isobutil-1-metilxantina, se induce la acumulación de AMPc por estimulación del receptor de dopamina con su ligando SKF-38393 durante 15 min. El AMPc acumulado es extraído de las células y cuantificado según el método de Nordstedt and Fredholm (Figura 6).

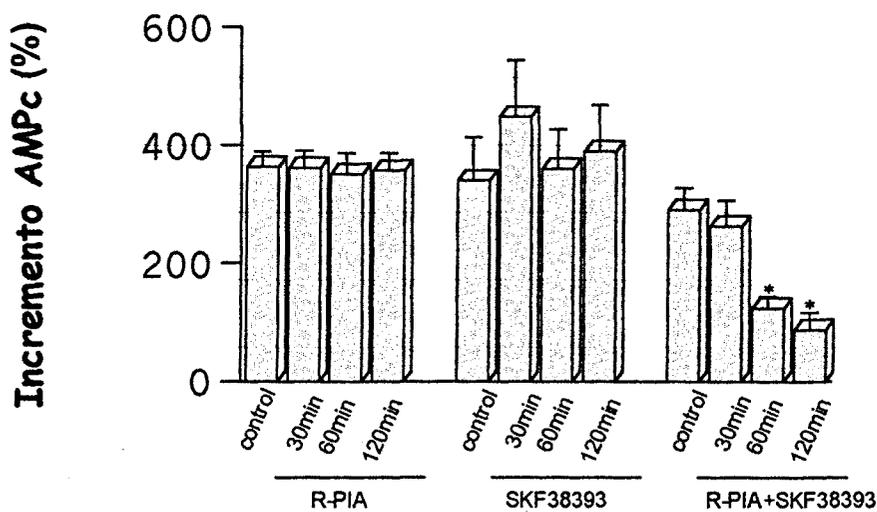


Figura 6. Acumulación de AMPc inducida tras la incubación (15min) con SKF-38393 10 μM. Las células se tratan previamente con R-PIA 100nM o con SKF-38393 10 μM tras lo cual se induce la acumulación del segundo mensajero al activar el receptor D₁ de dopamina vía SKF-38393. Las células control (naïve) se han tratado tan solo con medio durante 120min. Los valores representan mediana ± s.e.m del porcentaje de incremento en relación al valor basal. Los valores basales de AMPc acumulado para cada grupo tratado con R-PIA, SHK-38393, o ambos agonistas simultáneamente han sido (mediana ± s.e.m expresada en pmol/mg proteína), 110±20, 240±60 y 140±30 respectivamente. Test ANOVA con el test de post-hoc Sheffe's.

* p < 0.01.

En fibroblastos transfectados el agonista SKF-38393 a una concentración de $10\mu\text{M}$, no es capaz de desensibilizar el receptor D_1 de dopamina, desensibilización medida como acumulación de AMPc (Figura 6). El pretratamiento de las células con R-PIA tampoco produce cambios en los niveles de acumulación de AMPc tras la estimulación del receptor D_1 de dopamina, sin embargo el tratamiento combinado con R-PIA y SKF-38393 disminuye la respuesta del receptor D_1 . Tras 60 min de preincubación de las células con ambos agonistas, la respuesta del receptor D_1 disminuye hasta casi un 50 %. Estos resultados sugieren que la desensibilización del receptor D_1 de dopamina tan sólo se produce ante exposiciones prolongadas a ambos agonistas, el agonista del receptor A_1 de adenosina, R-PIA y el agonista del receptor D_1 de dopamina, SKF-38393.

4-Distribución de la ecto-ADA en los heterómeros A_1R/D_1R .

La distribución de la ecto-ADA en fibroblastos de rata doblemente transfectados con los cDNAs del receptor A_1 y el receptor D_1 se ha estudiado mediante inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal. Las células se tratan (materiales y métodos) para su posterior análisis por microscopía confocal marcándose un anticuerpo anti-ADA conjugado directamente a fluoresceína (anti-ADA-FITC) y con un anticuerpo anti- A_1R conjugado directamente a rodamina (PC21-TRITC) o un anticuerpo anti- D_1R conjugado a texas-red (anti- D_1 -Tx). En las células control (Figura 7A, 7B) el ADA presenta un marcaje homogéneo codistribuyendo tanto con el receptor de adenosina como con el receptor de dopamina. En ambos casos la colocalización es moderada no apreciándose grandes diferencias en el grado de colocalización entre el receptor A_1 de adenosina y la ADA y el receptor D_1 de dopamina y la ADA.

Figura 7A

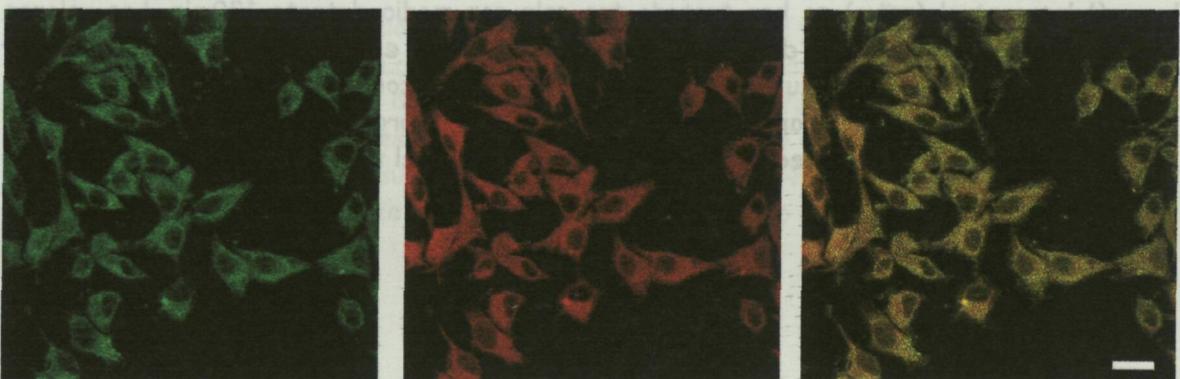


Figura 7B

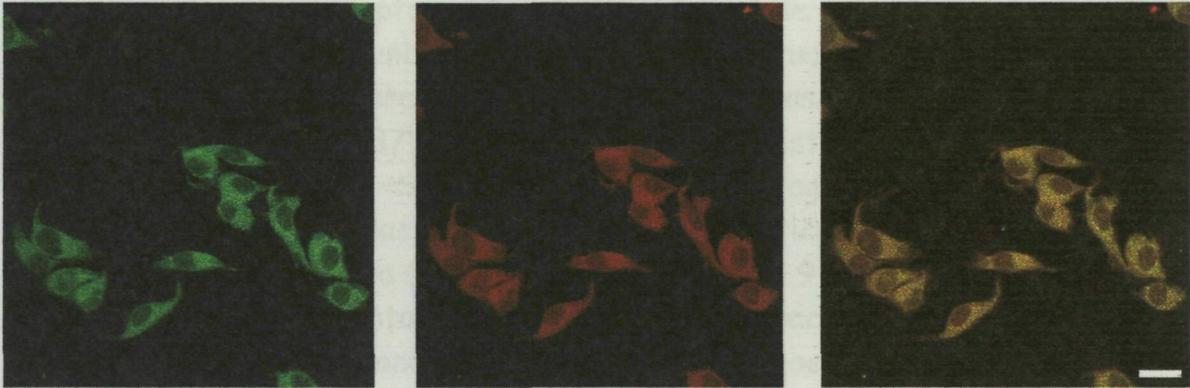


Figura 7. Colocalización entre el receptor A1 de adenosina y la ADA (Fig7A) y entre el receptor D1 de dopamina y la ADA (Fig 7B) en células A1R/D1R. Las células se han procesado para su análisis por microscopía confocal como se describe en materiales y métodos. Los anticuerpos utilizados en la inmunocitoquímica han sido un anticuerpo anti-ADA conjugado a fluoresceína y un anticuerpo anti-A1R conjugado a rodamina o un anticuerpo anti-D1 conjugado a texas red. La doble inmunofluorescencia se ha analizado por microscopía confocal. La colocalización se muestra en amarillo. Barra de escala 10 μ m.

Este resultado sugiere que los heterómeros A1R/D1R están constituidos por las tres proteínas, el receptor A1 de adenosina, el receptor D1 de dopamina y la ADA. Como hemos mencionado en el capítulo 1. 3. 3. 3. La ADA por sus características estructurales no puede unirse directamente a la membrana plasmática. El receptor A1 de adenosina en células DDT1MF-2 funciona como molécula de unión de la ADA. Puesto que en células A1R/D1R encontramos un grado de colocalización alto entre el receptor de dopamina y la ADA nos planteamos si la ADA podía también unirse al receptor D1 de dopamina. Para ello mediante inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo anti-ADA conjugado a fluoresceína hemos estudiado la presencia de ADA en la superficie celular de las células D1, células únicamente transfectadas con el receptor D1 de dopamina. Las células D₁ fijadas con paraformaldehído al 4 %, se incuban con un anticuerpo anti-ADA conjugado directamente a fluoresceína (ADA-FITC). Las células D₁ presentan un marcaje negativo para la ADA de la superficie celular (Figura 8A). Este resultado demuestra que tan sólo las células A1D1 que expresan receptor A1 de adenosina en la membrana plasmática presentan ADA en la superficie celular sugiriendo que sólo este receptor puede actuar como molécula de anclaje de la ADA.

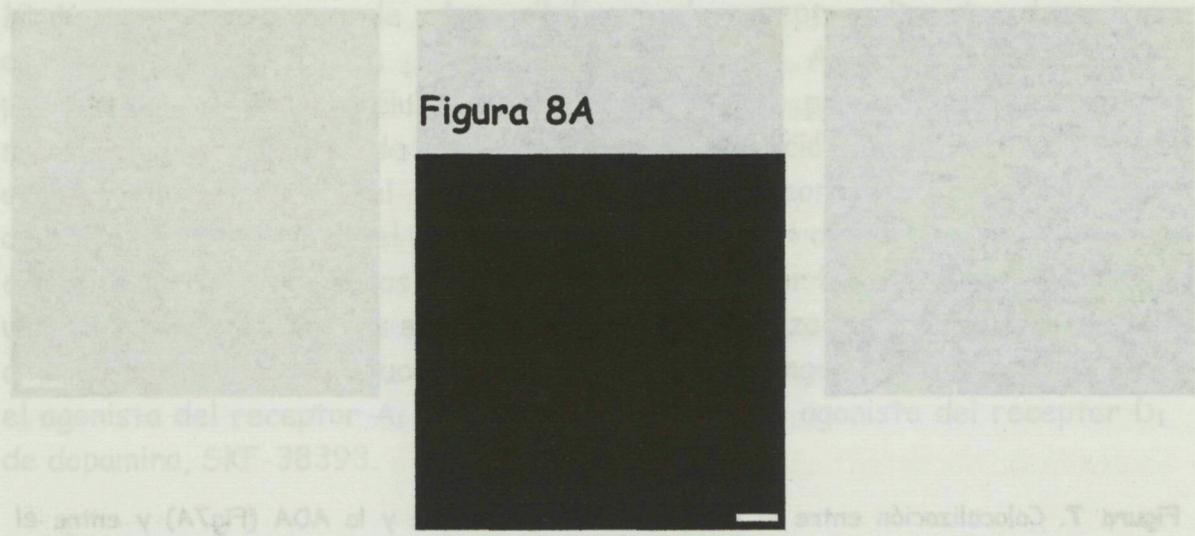


Figura 8A

Figura 8A. Expresión de la ADA en la superficie de las células D1. Las células se han fijado con paraformaldehído al 4 % y tras lavados exhaustivos se han marcado con un anticuerpo anti-ADA-FITC. Barra de escala. 10 μ m

Otra evidencia que pone de manifiesto que la ADA no puede unirse a la membrana de las células A1D1 vía el receptor de dopamina se obtiene tras la incubación de las células D1 con ADA exógena. La incubación con ADA no modifica las características de unión del receptor D1 de adenosina (Figura 8B).

	n	Kh (μ M)	KI (μ M)	RH (%)
control	12	0.20	57.35	14.6
Células D1 ADA	12	0.64	55.35	13.1

Figura 8B. Experimentos de inhibición competitiva de la dopamina versus el antagonista dopaminérgico [3 H]SCH-23390 en preparaciones de membrana de células D₁. Kh y KI corresponden a las constantes de disociación del estado de alta y baja afinidad respectivamente y RH corresponde al porcentaje de receptores en estado de alta afinidad y n el número de experimentos realizados.

Puesto que los agonistas adenosínicos y los dopaminérgicos pueden modular la distribución de los receptores A_1 y D_1 (apartado 1 de este capítulo) y ya que la ADA codistribuye con ambos receptores hemos estudiado la distribución de la ADA de superficie en presencia de dichos agonistas. Las células A_1R/D_1R se incuban durante 1 h a $37^\circ C$ en presencia del agonista adenosínico R-PIA, del agonista dopaminérgico SKF-38393 o de ambos agonistas simultáneamente antes de fijar las células e incubarlas con los anticuerpos anti-ADA-FITC y anti-PC21-TRITC (Figura 9A) o anti- D_1 -Tx (Figura 9B) El tratamiento con R-PIA agrega ambos receptores. La ADA tras la incubación con el agonista R-PIA también se agrega formando parte de estos complejos receptor-receptor.

Figura 9A

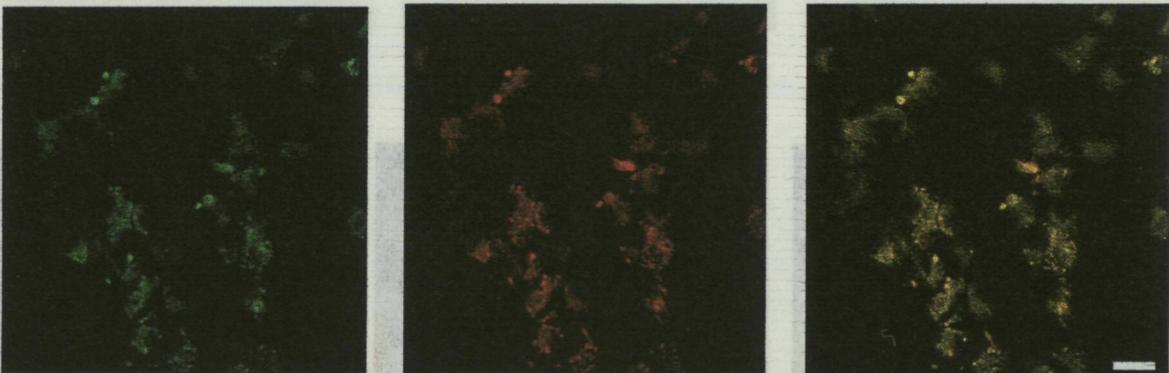


Figura 9B



El grado de colocalización en estos agregados es alto. En la Figura 9C se muestra la distribución del receptor de adenosina y la ADA tras el tratamiento de las células con el antagonista SKF-38393.

Figura 9C Puesto que los agonistas adenosínicos y los dopaminérgicos pueden

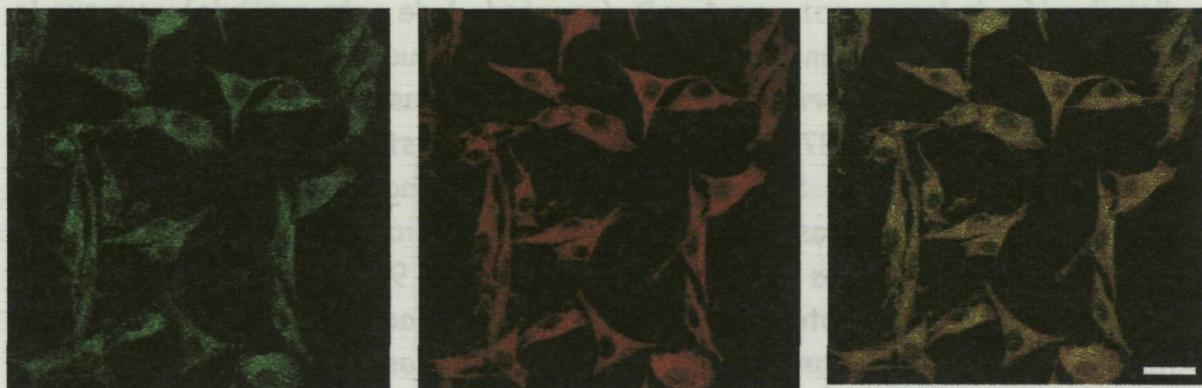
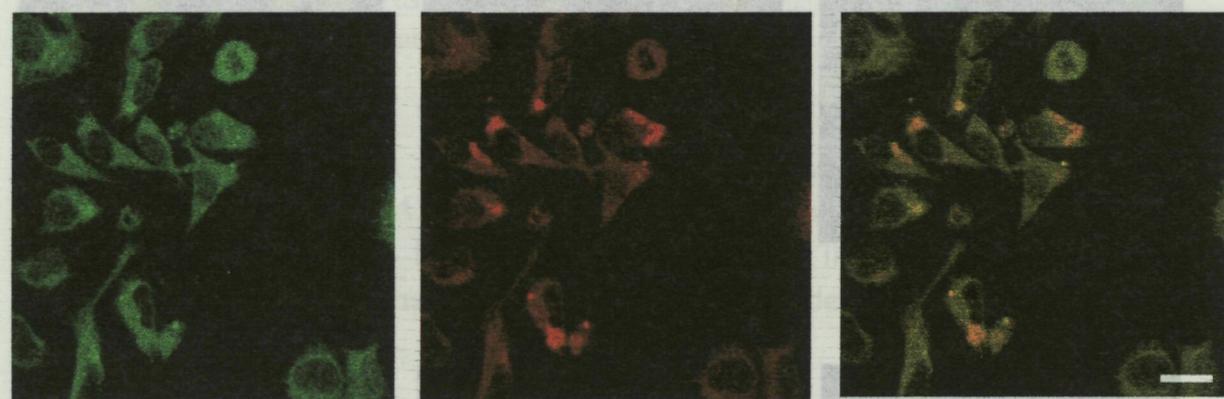


Figura 9D



Ambas proteínas presentan una distribución uniforme muy similar a la que se observa en las células control mostrando un grado de colocalización elevado. El agonista dopaminérgico sin embargo, no es capaz de clusterizar la ADA. En la Figura 9D se observan los agregados del receptor D₁ de dopamina inducidos tras la incubación con el agonista distribuidos sobre un marcaje homogéneo de la ADA. Cuando las células se incuban simultáneamente con ambos agonistas no se aprecia ningún cambio en la distribución de los receptores o de la ADA. En

ambos casos, el marcaje es difuso, uniforme y con un patrón muy similar al observado en las células control (Figura 9E, 9F).

Figura 9E



Figura 9F

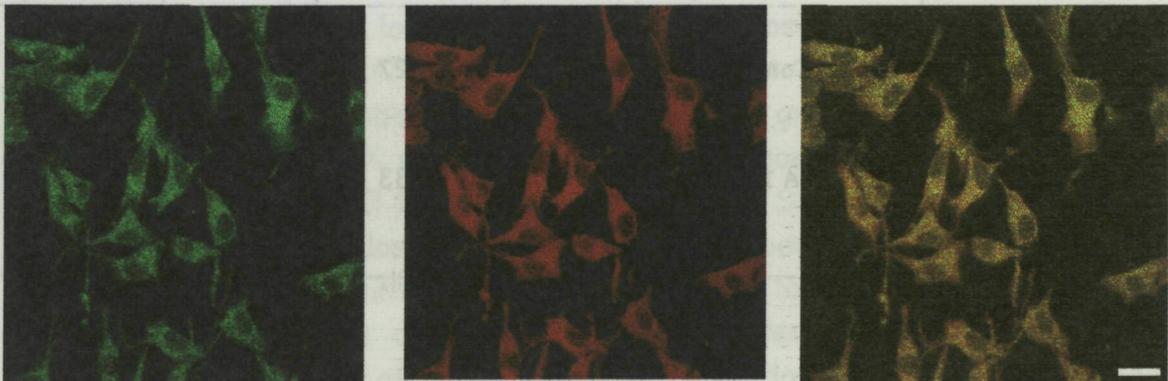


Figura 9. Distribución de la ADA en células A1R/D1R. Las células se han incubado durante 1h en presencia de R-PIA 100 nM (C y D), presencia de SKF-38393 10 μ M (E y F) o en presencia de ambos agonistas simultáneamente (G y H). Las células se han procesado para la inmunocitoquímica como se describe en materiales y métodos, marcándose con un anticuerpo anti-ADA conjugado a fluoresceína (verde) y un anticuerpo anti-A1R conjugado a rodamina (rojo) o un anticuerpo anti-D1 conjugado a Texas red (rojo). Las muestras se han analizado por microscopía confocal. La colocalización se muestra en amarillo. Barra de escala 10 μ m.

El receptor A₁ de adenosina tras el tratamiento con R-PIA, SKF-38393 o ambos agonistas simultáneamente, mantiene la codistribución con la ADA. Tal y como hemos mencionado en el capítulo 1.3.3.3 la ADA es necesaria para identificar el estado de alta afinidad del receptor, por lo que podemos hipotetizar que en estos agregados el receptor A₁ de adenosina se encuentra en su estado de alta afinidad modulando de este modo al receptor D₁ de dopamina. Los experimentos en células A₁R/D₁R de inhibición competitiva de la dopamina versus el antagonista dopaminérgico [³H]SCH-23390 en presencia del inhibidor de la ADA, desoxicoformicina (DCF), concuerdan con esta hipótesis (Figura 10)

		n	K _h (μM)	K _l (μM)	RH(%)
Células A ₁ D ₁	Control	6	0.97	67.00	10.5
	CPA	6	-	56.00	0
Células A ₁ D ₁ tratadas con DCF	Control	7	1.27	51.50	13.5
	CPA 10nM	7	0.33	51.10	12.9
Células A ₁ D ₁ tratadas con DCF	Control	9	0.27	48.80	12.4
	CPA 10μM	9	0.30	52.70	11.3

Figura 10. Experimentos de inhibición competitiva de la dopamina versus el antagonista dopaminérgico [³H]SCH-23390 en preparaciones de membrana de células D₁. K_h y K_l corresponden a las constantes de disociación del estado de alta y baja afinidad respectivamente y RH corresponde al porcentaje de receptores en estado de alta afinidad y n el número de experimentos realizados.

DISCUSIÓN.

En el sistema nervioso central y en especial en los ganglios basales, se han descrito efectos antagonistas entre los receptores de adenosina y los receptores de dopamina. Los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina modulan de forma antagónica y específica las características de unión y funcionales de los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 respectivamente (Ferre et al, 1991, 1994). En términos generales, en el sistema nervioso central, los agonistas de adenosina inhiben y los antagonistas como la cafeína potencian los efectos conductuales inducidos por los agonistas de dopamina. Los datos existentes sugieren que este antagonismo es debido a un *cross-talk* directo entre los receptores de adenosina y los receptores de dopamina no habiéndose descrito anteriormente que esta co-modulación pudiera deberse también a una interacción receptor-receptor.

En este trabajo se ha demostrado mediante coimmunoprecipitación, inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal en fibroblastos de rata cotransfectados con ambos receptores y en neuronas de córtex cerebral de rata, la asociación entre los receptores A_1 de adenosina y los receptores D_1 de dopamina. En los dos tipos celulares se ha encontrado un elevado grado de codistribución entre ambos receptores, siendo el grado de colocación en fibroblastos de un 71 % para el receptor de adenosina y de un 77 % para el receptor de dopamina. El tratamiento con R-PIA y SKF-38393 ha demostrado que la asociación entre los dos receptores está modulada por sus respectivos agonistas. Así el agonista adenosínico tanto en células A_1R/D_1R como en neuronas corticales, es capaz de agregar (*clusterizar*) ambos receptores, agregación que tan sólo afecta al receptor D_1 de dopamina cuando las células A_1R/D_1R son tratadas con el agonista dopaminérgico SKF-38393. Sorprendentemente en neuronas de córtex cerebral de rata, este agonista es capaz de modular ambos receptores, generando agregados en los que el grado de colocación entre el receptor de adenosina y el de dopamina es muy elevado. Estos resultados, sugieren que las neuronas presentan componentes que no se expresan en las células cotransfectadas y soporta la hipótesis que los receptores A_1 y D_1 en respuesta al tratamiento con SKF-38393, se agregan conjuntamente con otros componentes de la membrana no identificados todavía. En este sentido Brakeman et al, 1995, han descrito que la proteína *homer* que participa en el desarrollo cortical y contiene dominios PDZ-like, es capaz de interaccionar con el dominio carboxi-terminal de los receptores

metabotrópicos de glutamato, contribuyendo a la redistribución de este receptor en neuronas. Todos los resultados descritos referentes al *cross-talk* dopamina/adenosina sugieren la posibilidad de una interacción molecular entre subtipos de receptor A_1 de adenosina y subtipos de receptor D_1 de dopamina. Mediante técnicas de inmunoprecipitación se ha demostrado la existencia de una coprecipitación entre los receptores A_1 de adenosina y los receptores D_1 de dopamina. En células control un anticuerpo anti- A_1R es capaz de coinmunoprecipitar al receptor D_1 de dopamina. El tratamiento con el agonista SKF-38393 evita la coprecipitación del receptor de dopamina. Este hecho, esta de acuerdo con los datos obtenidos por microscopía confocal en los que el tratamiento con el agonista dopaminérgico conduce a la formación de agregados del propio receptor de dopamina pero sin modificar la distribución del receptor A_1 de adenosina. Por el contrario, el tratamiento con el agonista R-PIA, rinde una banda de 46 kDa correspondiente al receptor D_1 de dopamina aunque de intensidad menor respecto a las células control. Ello podría ser debido a una menor eficiencia de coinmunoprecipitación de los agregados generados tras la incubación de las células con R-PIA al ser el receptor A_1 de adenosina en estos agregados menos accesible al anticuerpo inmunoprecipitante.

El receptor D_1 de dopamina pertenece a la subfamilia de receptores D_1 -like acoplados vía proteína *Gs* al efector adenilato ciclasa. La estimulación del receptor por su ligando conduce a aumentos en los niveles de AMPc. Tras exposiciones prolongadas o crónicas al agonista las células atenúan su respuesta en un proceso conocido como desensibilización. El tratamiento prolongado con agonistas, conduce a la desensibilización del receptor D_1 de dopamina, el grado de desensibilización depende de la eficacia del agonista y del sistema de expresión del D_1R utilizado. En estas células la preincubación durante 30, 60 o 120 min con el agonista dopaminérgico SKF-38393 no desensibiliza el receptor D_1 de dopamina, ante un estímulo (SKF-38393, 15min) el receptor sigue señalizando. Puesto que en estas células el agonista SKF-38393 provoca la agregación del receptor D_1 de dopamina, estos resultados indican que en los agregados el receptor se encuentran funcionalmente acoplado a la adenilato ciclasa. Del mismo modo, el tratamiento con el agonista R-PIA que también causa agregación del receptor D_1 , no promueve cambios en la respuesta a AMPc. Sin embargo, el tratamiento simultáneo con ambos agonistas, que no modifica la distribución del receptor de dopamina, disminuye tras 60 min de preincubación los niveles del segundo mensajero. De estos resultados, se deduce que la disminución en la respuesta del receptor D_1 de

dopamina (desensibilización) tan sólo se observa en ausencia de agregación del receptor.

Trabajos previos han demostrado además que la ADA presenta un papel en la función del receptor A_1 de adenosina (capítulo 1. 3. 3. 3 de la Introducción). El ADA es necesaria para la identificación del estado de alta afinidad del receptor A_1 permitiendo de este modo que la transducción de la señal sea más eficiente, y a su vez la ADA está también implicada en el proceso de desensibilización del receptor acelerando el proceso de fosforilación e internalización (Ciruela et al, 1996; Saura et al, 1996, 1998, Franco et al, 1997). En experimentos realizados en células A_1R/D_1R pretratamiento de las células con la toxina pertusis (PTX) contraresta el efecto sobre el *binding* del receptor D_1 producido por bajas concentraciones del agonista CPA (concentraciones que sólo afectan al estado de alta afinidad). Por el contrario a altas concentraciones de CPA suficientes para unirse al receptor de baja afinidad el efecto no puede ser contrarrestado (Ferre et al, 1998). El principal efecto de la PTX es el desacoplamiento del receptor A_1 de su proteína G al ADP-ribosilar la subunidad α de la familia de proteínas G_i o G_o . Este desacoplamiento conduce a una reducción en el número de receptores A_1 en estado de alta afinidad y bloquea la transducción de la señal vía el receptor (Kurose et al, 1983). En un principio ante estos resultados podría hipotetizarse que la modulación de las características de unión del receptor D_1 de dopamina está mediada por los dos estados de afinidad del receptor. Sin embargo la ribosilación de la subunidad α inducida por la PTX no es completa para todas las proteínas G_i . Por lo tanto, es posible que la estimulación con elevadas concentraciones de CPA de cierta proporción de receptores A_1 de adenosina en estado de alta afinidad presentes tras la incubación con PTX sean capaces de reproducir el mismo efecto que el observado a bajas concentraciones de CPA. Todo parece pues indicar que es el receptor de adenosina en su estado de alta afinidad el que modula las características de unión del receptor D_1 de dopamina. Todo ello nos ha llevado a estudiar la distribución de la ADA en los complejos A_1R/D_1R y su papel en la modulación de las características de unión del receptor D_1 de dopamina por el receptor A_1 de adenosina.

En células A_1R/D_1R la ADA codistribuye tanto con el receptor A_1 de adenosina como con el receptor D_1 de dopamina. Estos resultados sugieren la presencia de ADA en los heterómeros A_1R/D_1R . Ante este resultado nos planteamos si el receptor D_1 de dopamina puesto que colocaliza con la ADA es capaz también de funcionar como molécula de unión de la misma. El marcaje con un anticuerpo anti-ADA-FITC en células tan sólo transfectadas con el receptor D_1 de

dopamina no revela la presencia de ADA en la superficie celular. Por otro lado, la incubación de las células D₁R con ADA exógena no modifica las características de unión del propio receptor. Estos resultados nos demuestran por un lado que es el receptor A₁ de adenosina el que en estos agregados funciona como vehículo de anclaje de la ADA y por otro lado que los efectos sobre la modulación del binding del receptor de dopamina no pueden ser inducidos directamente por la ADA. Todo ello nos sugiere que es el receptor A₁ de adenosina unido a la ADA y por lo tanto en su estado de alta afinidad el que modula el receptor D₁ de dopamina. Los experimentos de inhibición competitiva de la dopamina versus un antagonista del receptor de dopamina en presencia de CPA o CPA y Desoxicoformicina avalan esta hipótesis. En presencia del agonista adenosínico, tan sólo se identifica el estado de baja afinidad del receptor D₁ de dopamina. Tras la incubación con DCF que desacopla la ADA del receptor A₁ de adenosina, el CPA a concentraciones que tanto podrían estimular el estado de alta como el de baja afinidad, no es capaz de producir el mismo efecto. Estos datos ponen de manifiesto que el receptor de adenosina en su estado de alta afinidad, esto es acoplado a la ADA, modula de forma antagonista el receptor D₁ de dopamina. Si el receptor A₁ de adenosina en su estado de baja afinidad pudiera influir en el binding del receptor D₁ de dopamina, concentraciones de CPA 10 μ M serían suficientes para inducir la pérdida del estado de alta afinidad del receptor D₁ de dopamina.

Esta interacción a nivel funcional tiene su reflejo en la distribución de los receptores de adenosina, de dopamina y de la ADA tras la incubación con agonistas adenosínicos y dopaminérgicos.

El agonista R-PIA es capaz de modular los tres componentes del complejo, es decir, el receptor de adenosina, el receptor de dopamina y la ADA. Las tres proteínas forman agregados en los que el grado de colocación bien entre A₁R y la ADA o bien entre D₁R y la ADA es elevado. La incubación con SKF-38393 sólo afecta al receptor D₁ de dopamina provocando su agregación. Este agonista no modifica la distribución de la ADA que muestra un marcaje homogéneo. Por último la incubación simultánea con ambos agonistas no redistribuye a ningún componente de estos heterómeros. Así pues en presencia de ambos agonistas nos encontramos que los receptores así como la ADA no se agregan, en estas mismas condiciones el receptor de dopamina está desacoplado de la adenilato ciclasa ya que ante la activación del receptor (SKF-38393, 15 min) la respuesta respecto a las células control, es menor y por último en estas mismas condiciones en las que el receptor A₁ de adenosina está

acoplado a la ADA (estado de alta afinidad) la presencia de CPA modifica las características de unión del receptor de dopamina.

Estos resultados demuestran que la activación simultánea del receptor A_1 de adenosina y del receptor D_1 de dopamina, correlaciona con cambios significativos a nivel tanto morfológico como funcional. De modo que, la dinámica temporal de la activación y heteromerización del receptor, tiene un papel en la interacción A_1R/D_1R . Además, estos resultados pueden explicar el mecanismo por el que la activación del receptor A_1 de adenosina puede inducir desensibilización heteróloga del receptor D_1 de dopamina. Todos estos datos sugieren que el antagonismo *in vivo* entre A_1R/D_1R tiene lugar cuando la adenosina extracelular activa el receptor A_1 de adenosina en los heterómeros D_1R/A_1R presentes en la superficie celular.

