

11281

9
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

REGULACION DE LA FOSFORILACION DE LOS RECEPTORES ALFA_{1B}-ADRENERGICOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A :
LUZ DEL CARMEN MEDINA BAÑUELOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. J. ADOLFO GARCIA SAINZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1999

27 29 23



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mi familia,
especialmente a mi madre
por su apoyo constante.*

Agradecimientos:

Al Dr. J. Adolfo García Sáinz por su valiosa dirección para el desarrollo de esta tesis.

A mi comité tutorial por sus contribuciones en la discusión de los resultados de este trabajo:

Dr. J. Adolfo García Sáinz
Dr. Alejandro García Carrancá
Dr. Luis Vaca Domínguez

Al jurado por sus comentarios y sugerencias en la revisión del manuscrito final:

Dr. José Bargas Díaz
Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Dra. Laura Escobar Pérez
Dr. David García Díaz
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Dr. Enrique Ortega Soto
Dr. Gustavo Pedraza

A mis compañeros de laboratorio:

Rocío Alcántara, Eréndira Avendaño, Patricia Casas, Mario Cruz, Agustín García, Claudia González, Diana González, Artemio Mendoza, Alberto Olivares y Francisco Vázquez, por el tiempo compartido. En particular a Ma. Teresa Romero por su ayuda permanente durante mi estancia en el laboratorio.

A José Vázquez Prado por transmitirme su experiencia en el manejo de distintas técnicas y por su colaboración en el trabajo experimental.

Además, agradezco los apoyos institucionales que me permitieron realizar los estudios del Doctorado:

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. "*Programa de Becas para Estudios de Posgrado*".

CONACYT. "*Programa de Apoyo a los Profesores e Investigadores para la Obtención del Doctorado*".

**Esta tesis se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la
Universidad Nacional Autónoma de México,
bajo la dirección del Dr. J. Adolfo García Sáinz**

El presente trabajo fue financiado por:

**CONACyT (27569 N)
DGAPA (IN200596)**

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
Regulación de la Actividad de los Receptores Adrenérgicos	4
Papel de las GRKs en la Desensibilización	5
Papel de las Cinasas Activadas por Segundos Mensajeros en la Desensibilización	7
Secuestro	8
Resensibilización	10
“Down Regulation”	12
Regulación del Receptor α_{1B} -Adrenérgico	12
“Cross Talk” entre Receptores acoplados a Proteínas G y Receptores con Actividad de Tirosina Kinasa	15
Receptores con Actividad de Tirosina Kinasa	15
JUSTIFICACION	20
HIPOTESIS	21
RESULTADOS	22
La Activación de los Receptores ET_A de Endotelina Induce la Fosforilación de los Receptores α_{1B} -Adrenérgicos en Fibroblastos Rat-1	22
“Cross Talk”: Fosforilación de los Receptores α_{1B} -Adrenérgicos Inducida por la Activación de Receptores B_2 de Bradicinina	42
“Cross Talk” entre Receptores con Actividad de Tirosina Kinasa y los Receptores α_{1B} -Adrenérgicos	52
DISCUSION	67
Regulación del Receptor α_{1B} -Adrenérgico por la Endotelina	67
Regulación del Receptor α_{1B} -Adrenérgico por la Bradicinina	70
Regulación del Receptor α_{1B} -Adrenérgico por el EGF y PDGF	72
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFIA	75

RESUMEN

Este estudio se realizó para determinar: 1) las acciones moduladoras de receptores acoplados a proteínas G y de receptores con actividad de cinasa de tirosina sobre el nivel de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico y 2) si la regulación heteróloga de la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico modifica su actividad. Se utilizaron fibroblastos Rat-1 transfectados con el receptor α_{1B} -adrenérgico y la modificación en el estado de fosforilación del receptor se determinó mediante el marcaje metabólico de las células con [32 P]P_i e inmunoprecipitación del receptor con un anticuerpo específico dirigido contra un segmento del carboxilo terminal. La estimulación con el agonista NE o la activación directa de la PKC con TPA aumentaron significativamente la fosforilación basal del receptor α_{1B} -adrenérgico; la respuesta al TPA fue mayor respecto a la obtenida con NE. La activación de los receptores ET_A de endotelina estimuló la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico; el efecto fue de mayor magnitud que el de la NE y fue inhibido con el antagonista específico de los receptores ET_A, BQ-123. La PKC y cinasa(s) de tirosina intervienen en la fosforilación del receptor promovida por la endotelina, ya que la respuesta fue disminuida parcialmente con inhibidores de la PKC (estaurosporina) y de cinasas de tirosina (genisteína) y bloqueado casi por completo por la acción combinada de ambos inhibidores. El análisis de fosfoaminoácidos del receptor α_{1B} -adrenérgico inmunoprecipitado de las células tratadas con endotelina, mostró principalmente fosfoserina y cantidades pequeñas de fosfotreonina, pero no se detectó fosfotirosina, lo que sugiere que la(s) cinasa(s) de tirosina activada(s) por la endotelina actúan en un paso previo a la fosforilación del receptor. La activación de los receptores B₂ de bradicinina incrementó significativamente la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, aunque el nivel de respuesta fue mucho menor al obtenido con NE y endotelina. La fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico también fue aumentada de manera importante por la activación de los receptores de EGF y PDGF. Los efectos del EGF y PDGF fueron bloqueados por los inhibidores selectivos de la actividad de cinasa de tirosina del receptor, AG1478 y AG1296, respectivamente. La acción del EGF fue inhibida casi por completo en presencia de wortmanina (inhibidor específico de la PI3K), estaurosporina o Ro-318220 (inhibidores de la PKC), lo que sugiere la participación secuencial de las cinasas PI3K y PKC. Los receptores de PDGF actúan por una vía en la que interviene principalmente la PKC y en la que la PI3K no parece contribuir de manera importante; el efecto del PDGF fue suprimido totalmente en presencia de estaurosporina, pero no fue modificado por el tratamiento con wortmanina. El aumento en la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducido por la activación de los receptores ET_{1A}, de EGF y PDGF promueve la desensibilización heteróloga del receptor. La movilización de Ca²⁺ intracelular y/o el acoplamiento del receptor α_{1B} -adrenérgico a la proteína G_{q/11} producido por la NE fueron inhibidos significativamente por el pretratamiento con endotelina, EGF y PDGF. Por su parte, la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico estimulada por bradicinina no modifica la actividad del receptor. Los resultados indican que existe un "cross-talk" importante entre las vías desencadenadas por los receptores ET_{1A}, B₂ (acoplados a G_{q/11}), de EGF y PDGF (con actividad de cinasa de tirosina) y los receptores α_{1B} -adrenérgicos en fibroblastos Rat-1. Este tipo de regulación puede tener implicaciones fisiológicas importantes, ya que los receptores α_{1B} -adrenérgicos se expresan en numerosos tejidos y muchas de las acciones de las catecolaminas son mediadas por la activación de estos receptores.

ABSTRACT

This study was performed to determine: 1) the modulator actions of G protein-coupled receptors and receptors tyrosine kinase on phosphorylation of the α_{1B} -adrenergic receptor, and 2) whether the heterologous regulation of the α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation leads to modification in their activity. We used Rat-1 fibroblasts transfected with the α_{1B} -adrenergic receptors (α_{1B} -ARs) and the receptor phosphorylation was assessed by metabolic labeled of the cells with [32 P]P_i and immunoprecipitation of receptor with an antiserum raised against the carboxyl terminal of the α_{1B} -AR. Stimulation of cells with NE or TPA significantly increased basal phosphorylation of α_{1B} -adrenergic receptor. The response induced by TPA was greater than that of NE. Activation of ET_A receptors by endothelin stimulated the phosphorylation of α_{1B} -ARs. The effect of endothelin was greater than that of NE and was inhibited by the selective antagonist for ET_A receptors, BQ-123. The PKC and tyrosine kinase(s) mediated the endothelin-induced phosphorylation receptor, since response was reduced partially with inhibitors of PKC (staurosporine) or tyrosine kinases (genistein) and almost completely blocked by the combined treatment of both inhibitors. The phosphoaminoacid analysis of the α_{1B} -AR phosphorylated immunoprecipitated from cells treated with endothelin revealed mainly phosphoserine and small amounts of phosphothreonine, but phosphotyrosine was not detected, suggesting that the tyrosine kinase(s) activated by endothelin act in a previous step to phosphorylation receptor. The activation of B₂ receptors by bradykinin significantly increased α_{1B} -AR phosphorylation, however the bradykinin-induced response was smaller as compared with NE or endothelin. The α_{1B} -AR phosphorylation was also markedly increased by the activation of EGF and PDGF receptors. The effects of EGF and PDGF were prevented by the selective inhibitors of tyrosine kinase activity of the receptor, AG1478 and AG1296, respectively. The phosphorylation of α_{1B} -AR induced by EGF was almost completely inhibited by wortmannin (specific inhibitor of the PI3K), staurosporine or Ro-318220 (inhibitors of the PKC), suggesting the sequential action of PI3K and PKC. The PKC activation is essential in the PDGF signaling pathway that leads to phosphorylation of α_{1B} -AR, but the PI3K does not seem to play an important role in the action of PDGF. The response of PDGF was completely blocked by staurosporine, but it was not modified by selective inhibition of PI3K with wortmannin. The phosphorylation of α_{1B} -AR promoted by activation of ET_{1A}, EGF and PDGF receptors leads to heterologous desensitization of the receptor. The intracellular Ca²⁺ mobilization or G_{q/11} coupling receptor mediated by NE were significantly impaired by pretreatment with endothelin, EGF or PDGF. In contrast, the bradykinin increased the phosphorylation of α_{1B} -AR without inducing their desensitization. These results show that exists an important "cross-talk" between signaling pathways activated by ET_{1A}, B₂ receptors (coupled to G_{q/11}) or growth factor receptors (with intrinsic tyrosine kinase activity) and α_{1B} -ARs in fibroblasts Rat-1. Since the α_{1B} -adrenergic receptors are expressed in numerous tissues and many of the actions of the catecholamines are mediated by activation of these receptors, this type of regulation can have important physiological implications.

INTRODUCCION

Las respuestas celulares a las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) son mediadas por activación de receptores membranales específicos. A la fecha se han identificado 9 subtipos de receptores adrenérgicos: α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) y β (β_1 , β_2 , β_3). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G que se caracterizan por presentar un extremo amino terminal extracelular, segmentos de residuos de aminoácidos hidrofóbicos que forman siete dominios transmembranales, conectados por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares, y un extremo carboxilo terminal intracelular. El sitio de unión para el agonista se localiza dentro de los dominios transmembranales y las regiones citosólicas intervienen en el acoplamiento con las proteínas G (Dohlman y col., 1991; Strader y col., 1994).

Aunque los receptores adrenérgicos pueden activar diferentes vías de transducción de la señal, los receptores β -adrenérgicos se acoplan principalmente a la proteína G_s , activan a la adenilato ciclasa y aumentan los niveles intracelulares de AMPc; los receptores α_2 -adrenérgicos interactúan con la proteína G_i y disminuyen la actividad de la adenilato ciclasa y el nivel intracelular de AMPc. Los receptores α_1 -adrenérgicos se acoplan a las proteínas G_q y G_{11} ($G_{q/11}$) y activan a la fosfolipasa C- β (PLC β), que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$) e induce la formación de los segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG), responsables de la movilización de calcio intracelular y de la activación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente (Summers y McMartin, 1993) (Fig. 1).

La unión del agonista al receptor induce un cambio en la conformación del receptor que le permite acoplarse a la proteína G y formar el complejo de alta afinidad: agonista-receptor-proteína G. La interacción del receptor con la proteína G promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α . La subunidad α unida a GTP se disocia de las subunidades $\beta\gamma$; tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ regulan la actividad de las moléculas efectoras (adenilato ciclasa o PLC β). La unión de GTP a la subunidad α y la disociación del complejo $\beta\gamma$ también reduce la afinidad del receptor por el agonista. La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α , que hidroliza al GTP a GDP, regresa al sistema a su estado basal (Gilman, 1987; Neer, 1995).

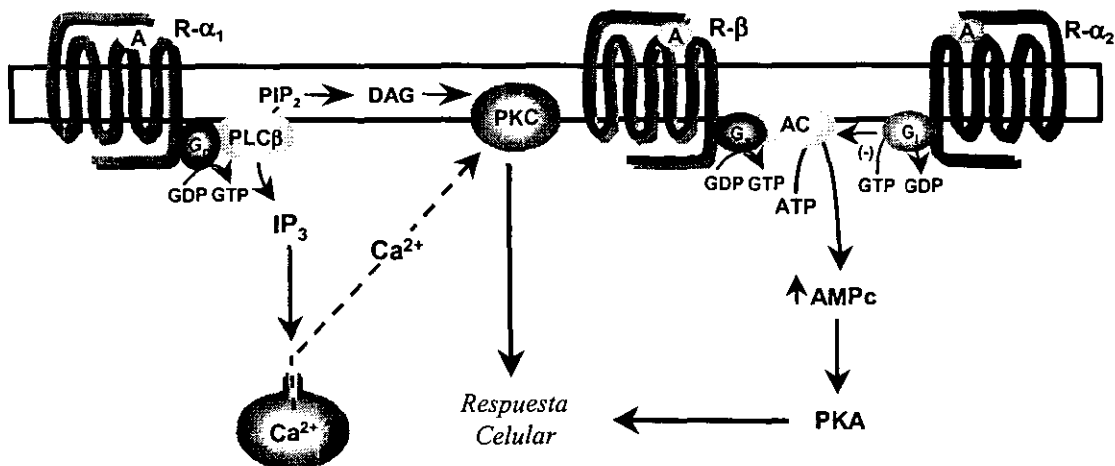


Fig. 1 Vías de Transducción de la Señal de los Receptores Adrenérgicos. A, agonista; R- α_1 , receptor α_1 -adrenérgico; R- α_2 , receptor α_2 -adrenérgico; R- β , receptor β -adrenérgico; AC, adenilato ciclasa; PLC β , fosfolipasa C- β ; PKC, proteína cinasa C; PKA, proteína cinasa A; PIP $_2$, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP $_3$, inositol, 1,4,5-trifosfato; DAG, diacilglicerol.

Regulación de la Actividad de los Receptores Adrenérgicos

La eficacia con la cual los receptores adrenérgicos transducen las señales extracelulares es regulada dinámicamente. Existen mecanismos de control que por un lado permiten que la célula responda rápidamente al agonista y por el otro la protegen de variaciones extremas y sostenidas en el ambiente externo. La estimulación prolongada del receptor es seguida por una disminución en la sensibilidad al agonista (**desensibilización**).

Se han identificado 2 patrones generales de desensibilización: **desensibilización homóloga** que se caracteriza por una disminución de la respuesta, limitada al receptor ocupado por el agonista y **desensibilización heteróloga** en la cual la estimulación de un receptor por su agonista disminuye la respuesta de otros receptores (Benovic y col., 1988; Hausdorff y col., 1990).

Los receptores β -adrenérgicos, en particular el subtipo β_2 , se han utilizado como sistema modelo para el estudio de los mecanismos que participan en la desensibilización.

En la desensibilización **homóloga** intervienen 3 procesos importantes: **a)** el **desacoplamiento** rápido (segundos a minutos) del receptor de la proteína G, sin pérdida en el número de receptores; **b)** el **secuestro**, a los pocos minutos de estimulación por el agonista, los receptores son secuestrados en compartimientos intracelulares, en donde permanecen inaccesibles al agonista; y **c)** la "**down regulation**", después de la estimulación prolongada por el agonista (horas) se presenta una disminución en la cantidad total de receptores, debido a la reducción en su síntesis o al aumento en su degradación. Estos tres eventos parecen ser regulados independientemente (Hausdorff y col., 1990; Lohse y col., 1990) (Fig. 2).

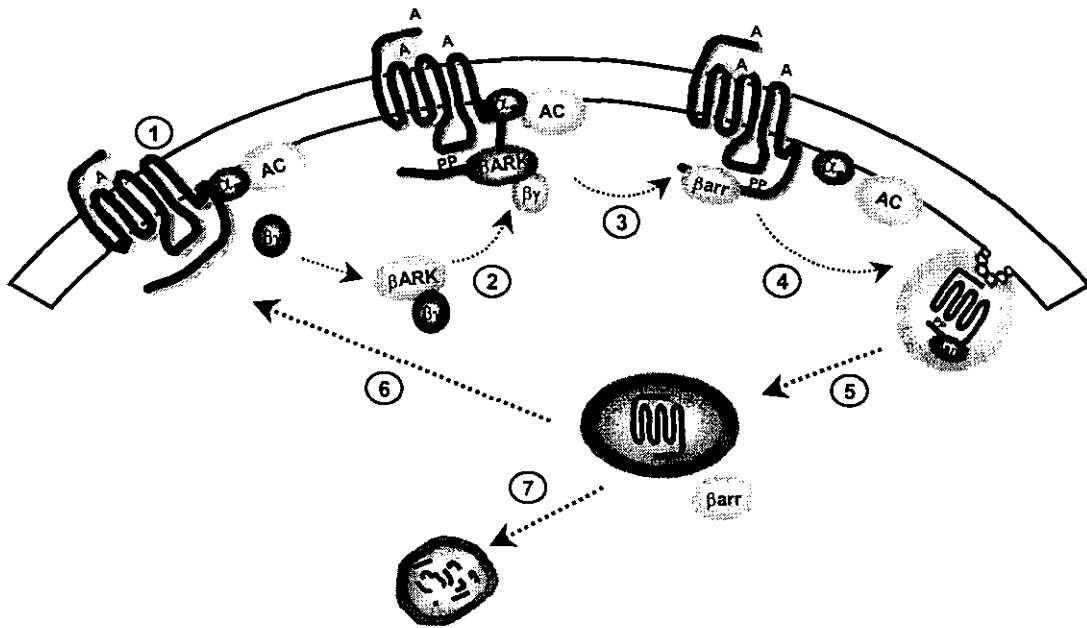


Fig. 2 Modelo de la Desensibilización del Receptor β -Adrenérgico. 1) Unión del agonista y activación del receptor; 2) fosforilación del receptor por β ARK; 3) unión de β -arrestina al receptor fosforilado y desacoplamiento de la proteína Gs; 4) secuestro del receptor en vesículas cubiertas de clatrina; 5) internalización en endosomas; 6) resensibilización del receptor; 7) degradación del receptor en lisosomas.

Un evento fundamental que interviene en la desensibilización rápida es la fosforilación del receptor, catalizada por al menos dos clases de cinasas con especificidad por residuos de serina y treonina: **las cinasas activadas por segundo mensajero**, como la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC) y **las cinasas de los receptores acoplados a proteína G (GRKs)**.

Papel de las GRKs en la Desensibilización

Se han identificado seis miembros de la familia de las GRKs: GRK1 o rodopsina cinasa, GRK2 o cinasa 1 del receptor β -adrenérgico (β ARK1), GRK3 o β ARK2, GRK4, GRK5 y GRK6. Estas cinasas se caracterizan por reconocer y fosforilar sólo a los receptores en su conformación activa (ocupados por el agonista), por lo que intervienen principalmente en la **desensibilización homóloga**. La presencia de varias GRKs en la célula sugiere que la fosforilación de un receptor puede ser mediada por más de una de estas cinasas. En particular la GRK2 y GRK3 presentan un rango amplio de especificidad por el sustrato, por lo que pueden regular la actividad de diversos receptores (Premont y col., 1995; Pitcher y col., 1998).

La actividad y localización celular de las GRKs son reguladas por diferentes mecanismos. En estado inactivo la GRK1, GRK2 y GRK3, se localizan en el citosol y cuando el sistema es activado se translocan a la membrana plasmática. El proceso es promovido por la interacción con el dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G, que es liberado de la subunidad α en respuesta a la

estimulación del receptor, y con el fosfolípido PIP₂. Tanto el complejo βγ como el PIP₂ se unen a un segmento con homología con la proteína plecstrina (dominio PH), localizado en el extremo carboxilo terminal de las cinasas, lo que produce su asociación con la membrana y aumenta su actividad catalítica. Los dominios PH intervienen en las interacciones proteína-proteína o proteína-fosfolípidos y están presentes en diversas proteínas implicadas en la transducción de señales. La asociación con la membrana plasmática para el resto de las GRKs incluye modificaciones postransduccionales que promueven la unión de lípidos, como la farnesilación (GRK1) y palmitoilación (GRK4 y GRK6) de residuos de cisteína presentes en el carboxilo terminal, o interacciones electrostáticas entre aminoácidos básicos del carboxilo terminal y fosfolípidos membranales (GRK5) (Inglese y col., 1993; Premont y col., 1995; Pitcher y col., 1998; Rebecchi y Scarlata, 1998).

La fosforilación del receptor por las GRKs produce el desacoplamiento parcial de la proteína G y permite la interacción de proteínas reguladoras, **arrestinas**, que al unirse al receptor fosforilado previenen por completo su acoplamiento con la proteína G. Estas proteínas constituyen una familia de la cual se han identificado 4 miembros: 2 arrestinas visuales (arrestina y C-arrestina) que se localizan principalmente en la retina y participan en la modulación de la fototransducción y 2 arrestinas no visuales (β-arrestina 1 y β-arrestina 2) que se distribuyen ampliamente y pueden intervenir en la regulación de diversos receptores (Inglese y col., 1993; Krupnick y Benovic, 1998).

En la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G los sitios potenciales de fosforilación por GRKs se localizan principalmente en el carboxilo terminal y en un subgrupo de ellos (muscarínicos m₁ y m₂, α_{2A}-adrenérgicos y de FSH) en la tercera asa intracelular. Estas regiones participan en el acoplamiento del receptor con la proteína G, por lo que su modificación por fosforilación puede interferir directamente en el acoplamiento con la proteína G (Ishii y col., 1994; Eason y col., 1995; Haga y col., 1996).

Los sitios exactos de fosforilación por las GRKs sólo se han identificado en un número limitado de receptores. Por ejemplo, la GRK1, GRK2 y GRK5 fosforilan residuos específicos del extremo carboxilo terminal de la rodopsina (Ser³³⁴, Ser³³⁸ y Ser³⁴³) y del receptor β₂-adrenérgico (Thr³⁸⁴, Ser³⁹³, Ser³⁹⁶, Ser⁴⁰¹, Ser⁴⁰⁷ y Ser⁴¹¹) (Hausdorff y col., 1989; Ohguro y col., 1996; Fredericks y col., 1996).

El papel de las GRKs y de diferentes cinasas en el proceso de desensibilización se ha examinado en células intactas por varias estrategias que incluyen: 1) el uso de inhibidores de las cinasas; 2) la sobreexpresión de una mutante dominante negativa de la GRK2, que es capaz de unirse al receptor ocupado por el agonista pero no presenta actividad catalítica, y por lo tanto actúa como inhibidor competitivo de las GRKs endógenas y 3) la supresión selectiva de cinasas individuales con oligodeoxinucléotidos antisentido (Kong y col., 1994; Shih y Malbon, 1994).

De esta forma, se ha demostrado la participación de las GRKs en la desensibilización homóloga en diferentes receptores acoplados al sistema de adenilato ciclasa. En células transfectadas con los receptores adrenérgicos (β₁, β₂ y α_{2A}-adrenérgicos), muscarínicos m₂ y δ-opioides, la sobreexpresión de GRK2, GRK3 o GRK5 aumenta significativamente la

fosforilación y desensibilización inducida por el agonista y el efecto es bloqueado por la coexpresión de una mutante dominante negativa de GRK2. En células tiroideas, en las que la GRK5 parece ser la isoforma predominante, la sobreexpresión de esta cinasa aumenta significativamente la desensibilización del receptor de tirotropina y su supresión con oligodeoxinucleótidos antisentido inhibe el efecto (Pippig y col., 1993; Kurose y Lefkowitz, 1994; Pei y col., 1995; Jewell-Motz y Liggett, 1996; Nagayama y col., 1996; Freedman y col., 1995; Schlador y Nathanson, 1997).

Papel de las Cinasas Activadas por Segundos Mensajeros en la Desensibilización

El estudio de la participación de las proteínas cinasas en la desensibilización de muchos de los receptores acoplados a proteína G es complicado ya que además de las GRKs, las cinasas activadas por segundos mensajeros (PKA y PKC) intervienen en la regulación de estos receptores. Estas cinasas suministran una vía de retroalimentación negativa para regular la sensibilidad del receptor por el cual fueron activadas y de esta manera pueden participar en la desensibilización homóloga. Sin embargo, estas enzimas también pueden modular a los receptores no ocupados por el agonista y contribuir de manera importante en la desensibilización heteróloga (Lohse y col., 1993).

Durante la estimulación por el agonista, las cinasas activadas por segundo mensajero son translocadas del citosol a diferentes sitios subcelulares, incluyendo la membrana plasmática. Esta translocación requiere de moléculas específicas denominadas receptores para cinasas C activadas (RACKs) y proteínas de anclaje de la cinasa A (AKAPs), que dirigen a las cinasas a los sitios membranales en donde se localizan sus receptores sustrato. Además, la especificidad de las diferentes isoenzimas de PKA y PKC parece ser determinada, al menos en parte, por la asociación con proteínas de anclaje particulares (Mochly-Rosen, 1995; Dell'Aqua y Scott, 1997).

De acuerdo a su estructura y sensibilidad a diferentes cofactores las isoenzimas de la PKC se agrupan en tres subfamilias: 1) **convencionales** (α , β I, β II y γ) que son activadas por Ca^{2+} , DAG, fosfatidilserina y ésteres del forbol; 2) **nuevas** (δ , ϵ , η y θ) no presentan el dominio de unión a Ca^{2+} y son activadas por DAG, fosfatidilserina y ésteres del forbol; 3) **atípicas** (ζ y λ) son insensibles al DAG, Ca^{2+} y ésteres del forbol. Otra enzima descrita (PKD/PKC μ) presenta características estructurales y funcionales diferentes a las de las subfamilias de PKC; es dependiente de fofolípidos, insensible al Ca^{2+} y activada por ésteres del forbol. El dominio catalítico de la PKD presenta poca similitud en su secuencia con los dominios cinasa de la familia de la PKC; la región NH_2 -terminal contiene regiones ricas en cisteína, que unen ésteres del forbol y DAG, semejantes a las de las PKCs nuevas y clásicas, además de una posible región transmembranal y un dominio PH, que no se encuentran en las PKCs (Valverde y col., 1994; Hofmann, 1997).

La desensibilización homóloga de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos puede ser mediada por la PKA y por las GRKs. Ambos subtipos de receptores contienen la secuencia de aminoácidos RRSS, identificada como secuencia consenso para la acción de PKA, en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo terminal; la PKA parece actuar preferentemente en el

sitio de la tercera asa intracelular. Además, el carboxilo terminal de estos receptores contiene sitios blanco para la fosforilación por GRK2 y GRK3. La eliminación de estos sitios por mutación reduce el grado de desensibilización del receptor (Hausdorff y col., 1989; Lefkowitz y col., 1990; Kennelly y Krebs, 1991; Freedman y col., 1995; Post y col., 1996).

La participación de la PKC en la regulación de la actividad del receptor se ha estudiado en células tratadas con ésteres del forbol, como el TPA (4 β -forbol 12-miristato 13-acetato), que activan directamente a la enzima. La PKC cataliza la fosforilación de proteínas sustrato que contienen las secuencias consenso: (S/T)-X-(K/R) o (K/R)-(S/T). El receptor β_2 -adrenérgico presenta 2 sitios consenso para la fosforilación mediada por PKC, uno localizado en la tercera asa intracelular y el otro en el carboxilo terminal; la fosforilación del sitio presente en la tercera asa intracelular parece ser la responsable de la desensibilización heteróloga inducida por TPA (Johnson y col., 1990; Kenelly y Krebs, 1991; Bouvier y col., 1991).

SECUESTRO

Además del desacoplamiento de los receptores de la proteína G, a los pocos minutos de estimulación por el agonista se presenta una disminución en la cantidad de receptores membranales, por un proceso que ocurre en dos etapas: 1) **secuestro**, los receptores son mantenidos en un compartimiento asociado a la membrana plasmática, en donde permanecen alejados del agonista, y 2) **internalización**, los receptores son aislados en vesículas intracelulares (Sibley y col., 1986; Cowlen y col., 1988; von Zastrow y Kobilka; 1992).

El análisis de estos procesos usualmente se realiza con radioligandos hidrofílicos que no atraviesan la membrana; la disminución en la unión de estos ligandos se toma como medida del secuestro o internalización de los receptores inducida por el agonista. Sólo recientemente, por microscopía confocal e inmunocitoquímica, se ha podido examinar la localización subcelular de los receptores y distinguir el secuestro de la internalización, por lo que, al igual que en la mayor parte de la literatura, se utilizará indistintamente ambos términos.

Una vía importante de internalización de receptores como los β_2 y α_{1B} -adrenérgicos, 5HT_{1A} de serotonina, el receptor del péptido liberador de gastrina y V₂ de vasopresina, es la endocitosis mediada por vesículas cubiertas de clatrina. Se ha descrito una vía alternativa dependiente de caveolas para varios receptores, incluyendo a los ET_A de endotelina, AT_{1A} de angiotensina, B₂ de bradicinina y de colecistocinina A. En células pancreáticas la estimulación por el agonista induce la migración del receptor de colecistocinina A a un compartimiento membranal, diferente de las caveolas o de las vesículas de clatrina (von Zastrow y Kobilka, 1992, Hocher y col., 1992; Chun y col., 1994; Roettger y col., 1995a,b; Fonseca y col., 1995; Berry y col., 1996; Zhang y col., 1996; de Weerd y Leeb-Lundberg 1997; Barak y col., 1997).

Varios estudios de mutagénesis sugieren la participación de diferentes dominios intracelulares del receptor en la internalización. La eliminación de regiones con cantidades elevadas de residuos de serina y treonina, del carboxilo terminal de los receptores β_2 -adrenérgicos, AT_{1A}, de TRH, de colecistocinina A, de neurotensina y del péptido liberador de gastrina, o de la tercera asa intracelular de los receptores muscarínicos m₁, m₂ y m₃, bloquea la internalización

inducida por el agonista. La sustitución de un sólo aminoácido en el carboxilo terminal del receptor H₂ de histamina (Thr³¹⁵) y del receptor de neurotensina (Thr⁴²² o Thr⁴²⁵) inhibe su internalización (Hausdorff y col., 1991; Benya y col., 1993; Nussenzveig y col., 1993; Moro y col., 1993; Chabry y col., 1995; Thomas y col., 1995; Fukushima y col. 1997).

La presencia de un residuo hidrofóbico (Z) en la secuencia DRYXXI(V)XXZ, localizada en la segunda asa intracelular de muchos de los receptores acoplados a proteínas G, parece ser una señal importante para la internalización de los receptores muscarínicos m₁, β₂-adrenérgicos y B₂ de bradicinina (Moro y col., 1994; Prado y col., 1998).

Asimismo, el residuo de tirosina de la secuencia NPxx₂₋₃Y, presente en la zona citoplasmática del séptimo dominio transmembranal de la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, se ha implicado en el secuestro de algunos receptores. La mutación de la Tyr³²⁶ en el receptor β₂-adrenérgico (Y326A) y de la Tyr³⁴⁸ en el receptor α_{1B}-adrenérgico (Y348A), incluidas en esta secuencia, bloquea la internalización. Sin embargo, una mutación similar no afecta el secuestro del receptor AT_{1A} o del receptor para el péptido liberador de gastrina (Slice y col., 1994; Barak y col., 1994; Ménard y col., 1997; Thomas y col., 1995; Gabilondo y col., 1996; Wang y col., 1997).

Ya que las regiones que contienen residuos de serina, treonina y tirosina son importantes para la internalización de distintos receptores, la fosforilación por diferentes cinasas puede ser una señal de inicio para el proceso. El secuestro de los receptores muscarínicos m₂ y β₂-adrenérgicos es facilitado por la coexpresión de GRK2 y disminuido por una mutante dominante negativa de la enzima. En células HEK-293 transfectadas con una mutante del receptor β₂-adrenérgico (Y326A) deficiente en el secuestro, la cotransfección de GRK2, GRK3 o GRK5 restablece el secuestro. La capacidad de la GRK2 para promover el secuestro de los receptores muscarínicos m₂ y β₂-adrenérgicos es aumentada por la coexpresión de β-arrestinas y una mutante dominante negativa de la β-arrestina 1 inhibe la internalización de los receptores β₂-adrenérgicos y muscarínicos m₁, m₃ y m₄, lo que indica un papel importante de las arrestinas en la regulación del proceso (Tsuga y col., 1994, 1998; Ferguson y col., 1995, 1996; Ménard y col., 1996, 1997; Schlador y Nathanson, 1997; Vögler y col., 1999).

Las β-arrestinas probablemente actúan como moléculas adaptadoras que dirigen a los receptores a las vesículas cubiertas de clatrina. En estado inactivo las β-arrestinas son fosfoproteínas que se localizan principalmente en el citosol y durante la estimulación del receptor por el agonista son translocadas a la membrana plasmática, en donde se unen al receptor fosforilado y lo desacoplan de la proteínas G. Las β-arrestinas son desfosforiladas en la membrana plasmática y sólo en esta forma son capaces de transportar a los receptores a las vesículas cubiertas de clatrina, en donde interactúan directamente con la clatrina. Para la internalización de los receptores se requiere además de la dinamina, una GTPasa que interviene en la formación de las vesículas cubiertas de clatrina (Gurevich y col., 1995; Damke, 1996; Goodman y col., 1996; Ferguson y col., 1996; Zhang y col., 1996, 1997; Krupnick y col., 1997; Lin y col., 1997).

RESENSIBILIZACION

Aún cuando en algunos tipos celulares el secuestro puede contribuir a la desensibilización del receptor, se ha propuesto que tiene un papel más importante en la recuperación de la actividad de los receptores desensibilizados (**resensibilización**) y en su reciclaje a la membrana plasmática. Por medio del secuestro los receptores son conducidos a los endosomas, en donde son desfosforilados por una fosfatasa específica para receptores acoplados a proteína G (GRP), cuya actividad es aumentada por el ambiente ácido del endosoma. Posteriormente los receptores son reciclados a la superficie celular por un mecanismo que aún no se ha caracterizado (Pitcher y col., 1995; Krueger y col., 1997; Koenig y Edwardson, 1997).

Diferentes evidencias apoyan la importancia del secuestro en la recuperación de la actividad del receptor. La resensibilización del receptor β_2 -adrenérgico es inhibida por el bloqueo del secuestro (con concanavalina A o sacarosa hiperosmótica) o por mutaciones en el receptor. El receptor β_2 -adrenérgico presente en los endosomas se encuentra menos fosforilado que en la membrana plasmática y no es resensibilizado si se bloquea el reciclaje a la membrana con monensina. La inhibición de la internalización disminuye el nivel de desfosforilación del receptor B_2 de bradicinina y la desfosforilación y el reciclaje del receptor de sustancia P son esenciales para su resensibilización (Sibley y col., 1986; Yu y col., 1993; Barak y col., 1994; Pippig y col., 1995; Blaukat y col., 1996; Garland y col., 1996).

Ya que la eficacia de la resensibilización de los receptores requiere de la internalización, el sinergismo de la β ARK y la β -arrestina puede ser igualmente importante en la regulación de la resensibilización como lo es para la disminución de la transducción de la señal de los receptores. En células HEK-293 transfectadas con el receptor β_2 -adrenérgico el secuestro es inhibido por una mutante dominante negativa de la β -arrestina y esto se acompaña de la disminución en la desfosforilación y resensibilización del receptor. Asimismo, en células transfectadas con la mutante del receptor β_2 -adrenérgico (Y326A), la sobreexpresión de la β ARK y β -arrestina restablece la falla en el secuestro y facilita su resensibilización, mientras que la sobreexpresión de la mutante dominante negativa de la β -arrestina bloquea el efecto (Ferguson y col., 1996; Zhang y col., 1997).

La internalización no parece ser un requisito común para la resensibilización de todos los receptores acoplados a proteína G. Por ejemplo, la resensibilización del receptor muscarínico m_4 aparentemente ocurre en la membrana plasmática y la internalización del receptor retarda de manera importante la recuperación del receptor; una mutante del receptor (T399A) deficiente en la internalización se resensibiliza más rápido que el receptor silvestre (Bogatekewitsch y col., 1996).

También se ha propuesto la participación de la PKC en el proceso de resensibilización. En células A431 la supresión de la actividad de la PKC con oligodesoxinucleótidos antisentido o con inhibidores específicos inhibe la recuperación de la actividad de los receptores β_2 -adrenérgicos. La activación de la PKC con ésteres del forbol induce la fosforilación y activación de la fosfatasa 2B que probablemente es la responsable de la desfosforilación y resensibilización del receptor β_2 -adrenérgicos en estas células (Shih y Malbon, 1996).

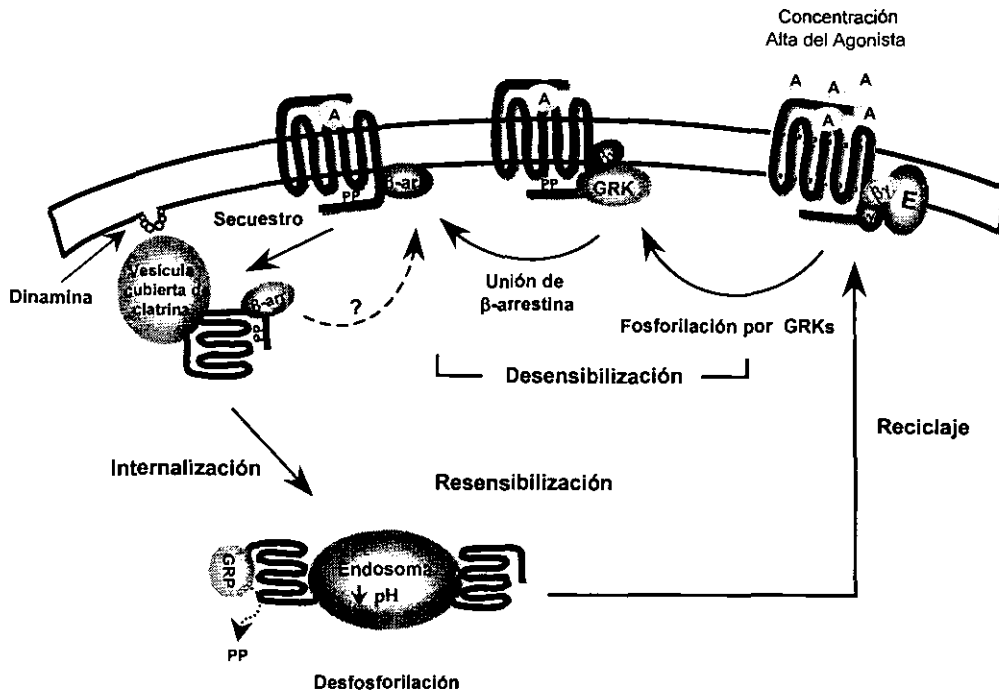


Fig. 3 Modelo de la Desensibilización y Resensibilización de los Receptores Acoplados a Proteínas G. A, agonista; E, efector; β-arr, β-arrestina; GRP, fosfatasa de receptores acoplados a proteínas G; PP, sitios de fosforilación para GRKs

A partir de la información obtenida con el receptor β_2 -adrenergico se puede plantear un modelo para explicar la serie de eventos que ocurren en la internalización del receptor. La fosforilación del receptor por las GRKs promueve la translocación de la β -arrestina a la membrana plasmática y su unión al receptor, lo que produce el desacoplamiento del receptor de la proteína G y el inicio de la internalización. A la vez la β -arrestina es desfosforilada en la membrana plasmática por una fosfatasa cuya naturaleza se desconoce. El complejo receptor fosforilado- β -arrestina se desplaza a las vesículas cubiertas de clatrina, en donde la β -arrestina se une a la clatrina. La hidrólisis de GTP por la dinamina permite la separación de estas vesículas de la membrana plasmática. El receptor y la β -arrestina dentro de las vesículas de clatrina se desplazan hacia los endosomas. La disminución del pH endosomal promueve la asociación de la fosfatasa de receptores acoplados a proteínas G (GRP) con el receptor y su desfosforilación subsecuente. Posteriormente el receptor es reciclado a la membrana plasmática para iniciar un nuevo ciclo de activación y desactivación (Fig. 3).

"DOWN REGULATION"

Además de los eventos rápidos de desacoplamiento y secuestro, durante la desensibilización se presenta una disminución en la cantidad total de receptores celulares, por un proceso que se conoce como "**down regulation**". Este evento se presenta durante la estimulación prolongada (horas) por el agonista y puede deberse al aumento en la degradación de los receptores y/o a la disminución en su síntesis. En algunos tipos celulares la recuperación del nivel normal de receptores membranales es mucho más lenta que su desaparición y requiere de la síntesis de proteínas, lo que sugiere que los receptores son degradados proteolíticamente por la fusión de las vesículas de secuestro con lisosomas. La estimulación persistente del receptor también produce una disminución significativa en los niveles del mRNA que codifica para el receptor, debido a la desestabilización del mensajero (Bouvier y col., 1989; Hadcock y col., 1988; Karoor y col., 1996).

Regulación del Receptor α_{1B} -Adrenérgico

En comparación con los receptores β -adrenérgicos, existe poca información acerca de los mecanismos que participan en la desensibilización de los receptores α_1 -adrenérgicos, y en general de los receptores acoplados a la vía de recambio de fosfoinosítidos. Esto se debe a la complejidad de los eventos intracelulares que intervienen en la transducción de la señal mediada por estos receptores. Además de la vía de recambio de fosfoinosítidos, otras vías de transducción de la señal, como la PLD específica para fosfatidilcolina y la PLA₂, también pueden ser activadas por la estimulación de estos receptores. Las diversas interacciones de retroalimentación que se establecen entre estas vías, así como las dificultades metodológicas para el análisis de la cinética de la síntesis y degradación de los fosfatos de inositol ha obstaculizado el estudio de la desensibilización de los receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos y ha conducido a reportes muy variados acerca de su susceptibilidad a la desensibilización (Minneman, 1988; Wojcikiewicz y col., 1993).

A pesar de esto, se ha confirmado la desensibilización rápida de estos receptores en distintos tipos celulares. En células DDT1-MF2 de músculo liso la desensibilización de la respuesta inducida por la norepinefrina se asocia con la fosforilación y desacoplamiento de los receptores α_1 -adrenérgicos. La modificación del receptor muy probablemente es catalizada por la PKC, que es activada por el diacilglicerol formado como resultado de la estimulación del sistema (Leeb-Lundberg y col., 1985, 1987).

Diferentes evidencias apoyan el papel de la PKC en la desensibilización de los receptores α_1 -adrenérgicos. La activación directa de la enzima con ésteres del forbol (TPA) disminuye las respuestas α_1 -adrenérgicas en varios sistemas. Los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos presentan diferente sensibilidad a los efectos reguladores de la PKC en hepáticos de especies que los expresan endógenamente. En fibroblastos Rat-1 transfectados con el subtipo α_{1D} se observa la mayor sensibilidad y en células con el subtipo α_{1A} la menor sensibilidad al efecto bloqueador del TPA (Corvera y García-Sáinz, 1984; Leeb-Lundberg y col., 1985, 1987; Cotecchia y col., 1985; García-Sáinz y Macías-Silva, 1995; Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996).

Estas variaciones en la desensibilización mediada por PKC muy probablemente se deben a diferencias estructurales entre los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en la segunda y tercera asas intracelulares y en el carboxilo terminal, regiones en las que se encuentran sitios blanco para la fosforilación por PKC y cuya proporción varía de acuerdo al subtipo de receptor: el α_{1D} presenta seis, el α_{1B} cuatro y el α_{1A} tres secuencias consenso para PKC. La eliminación por mutación del carboxilo terminal del receptor α_{1B} -adrenérgico previene la fosforilación y desensibilización inducida por TPA. En esta región del receptor se han identificado a los residuos Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰ como sitios de fosforilación para PKC (Lattion y col., 1994; Diviani y col., 1997).

Otros ejemplos de receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos que actúan como sustrato para PKC incluyen a los muscarínicos m_1 y m_3 , NK₂ de neurocinina A, de colecistocinina pancreáticos, AT_{1A} de angiotensina, histaminérgicos H₁ y serotoninérgicos 5-HT_{1A}. Los sitios blanco para la fosforilación por PKC se ubican en el carboxilo terminal (receptores AT_{1A}, muscarínicos m_1 y de tromboxano A₂) o en la tercera asa intracelular (receptores 5HT_{1A} y de colecistocinina pancreáticos) (Alblas y col., 1995; Lembo y Albert, 1995; Haga y col., 1996; Oppermann y col., 1996; Rao y col., 1997; Smith y col., 1998; Fujimoto y col., 1999).

Aunque distintas evidencias sugieren el papel de la PKC en la desensibilización homóloga, los datos no son concluyentes. Por ejemplo, la estimulación aguda con TPA produce la fosforilación y desensibilización de los receptores α_{1B} -adrenérgico, AT_{1A} e histaminérgicos H₁. Sin embargo, la disminución en la concentración celular de PKC, o el bloqueo de su actividad por tratamiento con inhibidores de la cinasa, no modifica la desensibilización inducida por el agonista. Esto sugiere que la desensibilización homóloga de estos receptores puede requerir de la participación de isoenzimas de la PKC que son insensibles a la activación por TPA, o de cinasas diferentes como las GRKs (Smit y col., 1992; Lattion y col., 1994; Oppermann y col., 1996; Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996).

En células COS-7 y HEK-293 transfectadas con el receptor α_{1B} -adrenérgico, la coexpresión de la GRK2 o GRK3 aumenta significativamente la fosforilación y desensibilización homóloga del receptor y el efecto es bloqueado por la coexpresión de una mutante dominante negativa de estas cinasas. Una reducción de la respuesta del receptor también se presenta por la coexpresión de las β -arrestinas. Al igual que en muchos receptores, el carboxilo terminal del receptor α_{1B} -adrenérgico parece ser el dominio de interacción para las GRKs y β -arrestinas, ya que la eliminación por mutación de un segmento del carboxilo terminal que contiene sitios blanco para las GRKs disminuye significativamente la fosforilación y desensibilización del receptor inducida por el agonista. Recientemente se han identificado en esta región residuos específicos (Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰) para la fosforilación catalizada por GRK2 (Lattion y col., 1994; Diviani y col., 1996, 1997).

Es probable que tanto la PKC como las GRKs intervengan en la desensibilización del receptor, aunque su contribución y mecanismos de regulación pueden variar en distintos receptores. Las GRKs juegan un papel importante en la desensibilización homóloga de los receptores α_{1B} -adrenérgicos, ET_A y ET_B de endotelina, AT_{1A} y muscarínicos m_1 , mientras que la desensibilización heteróloga de estos receptores es mediada por la PKC. Diferentes estudios de

mutagénesis indican que la PKC interviene en la desensibilización homóloga de los receptores 5-HT_{1A}, del péptido liberador de gastrina y de tromboxano A₂. En el caso del receptor NK₂ de neurocinina A, la PKC participa en la regulación homóloga y heteróloga. Esta variabilidad también se observa de acuerdo al tipo celular; en células CHO y HEK-293 transfectadas con el receptor AT_{1A}, la desensibilización homóloga del receptor es mediada por las GRKs, pero no por la PKC, mientras que en células mesangiales la PKC es esencial en este tipo de desensibilización. Esto indica que los receptores pueden ser regulados de manera diferente en distintas líneas celulares, lo que puede relacionarse con diferencias en el complemento celular de cinasas y fosfatasa que actúan sobre el receptor (Pfeilschifter y col., 1990; Barker y col., 1995; Benya y col., 1995; Alblas y col., 1995; Lembo y Albert, 1995; Haga y col., 1996; Oppermann y col., 1996; Diviani y col., 1996, 1997; Freedman y col., 1997; Spurney, 1999).

En algunos sistemas la acción coordinada de ambas cinasas puede ser necesaria para la desensibilización homóloga del receptor. La PKC es capaz de fosforilar y activar a la GRK2 *in vitro*, y en células transfectadas con la GRK2 la estimulación con el agonista o con TPA promueve la translocación de la cinasa a la membrana y aumenta su actividad. Así, es probable que la PKC y las GRKs actúen de manera secuencial en el proceso de desensibilización; la PKC puede activar y dirigir a la membrana a las GRKs, que a su vez pueden ser las responsables de la fosforilación del receptor ocupado por el agonista (Chuang y col., 1995; Winstel y col., 1996).

Por otro lado, también se ha demostrado la participación de la PKC en el proceso de **secuestro**. La estimulación de la PKC restablece la falla en el secuestro de la mutante del receptor α_{1B} -adrenérgico (Y348A), de manera similar a lo que se observa en la mutante del receptor β_2 -adrenérgico (Y326A) por la sobreexpresión de la GRK2. En células HEK-293 transfectadas con el receptor α_{1B} -adrenérgico, la estimulación con norepinefrina o la activación directa de la PKC con TPA promueve el secuestro de receptor en endosomas y la inhibición selectiva de la enzima bloquea el efecto. Resultados similares se observan en otros sistemas de transfección (células CHO) o en células que expresan endógenamente el receptor α_{1B} -adrenérgico (células DDT1 MF-2). Sin embargo, el nivel de contribución de la PKC en el secuestro del receptor depende de la naturaleza del estímulo (agonista *vs* TPA) y de si el receptor es transfectado o expresado naturalmente en la célula, lo que sugiere que las vías de internalización o mecanismos de regulación pueden ser específicas del tipo celular (Cowlen y Toews, 1988; Scherer y col., 1990; Benya y col., 1995; Fonseca y col., 1995; Zhu y col., 1996; Wang y col., 1997).

“CROSS-TALK” ENTRE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G Y RECEPTORES CON ACTIVIDAD DE CINASA DE TIROSINA

Además de sus acciones metabólicas, los receptores acoplados a proteínas G pueden inducir el crecimiento y diferenciación celular, mediante la activación de la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Clásicamente esta vía se ha asociado a la transducción de señales de los receptores con actividad de cinasa de tirosina. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la existencia de múltiples interacciones reguladoras entre los receptores acoplados a proteínas G y los receptores con actividad de cinasa de tirosina y se ha identificado a las MAPKs como integradores para las señales mitogénicas originadas de ambos tipos de receptores (Gutkind, 1998).

Las MAPKs constituyen una familia de cinasas con especificidad por residuos de serina y treonina que se agrupan en tres subfamilias: 1) las **MAPKs** (p44^{mapk} y p42^{mapk}) o cinasas reguladas por señales extracelulares, **ERKs** (ERK1 y ERK2); 2) las cinasas Jun N-terminal (**JNKs**) o cinasas activadas por estrés (**JNK/SAPKs**); 3) las **p38 MAPKs**. La activación de estas cinasas es iniciada por las proteínas G monoméricas, **Ras** (Ras, Rac y cdc42) que promueven la fosforilación y estimulación secuencial de diferentes enzimas: las MAPK cinasas (MAPKKKs), que fosforilan y activan a las MAPK cinasas (MAPKKs), que a su vez estimulan a las MAPKs. Las vías de las JNKs y p38 MAPKs son desencadenadas por estímulos que causan estrés celular (radiación UV, choque osmótico, estrés oxidativo, etc.) y por mediadores inflamatorios, mientras que las ERKs son activadas por factores de crecimiento (Cobb y Goldsmith, 1995; Kyriakis y Avruch, 1996; Ip y Davis, 1998) (Fig. 4).

Receptores con Actividad de Cinasa de Tirosina

Los receptores para factores de crecimiento epidérmico (EGF) y derivado de plaquetas (PDGF) son miembros representativos de la familia de receptores con actividad de cinasa de tirosina. Estos receptores presentan un sólo dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembranal y un dominio intracelular con actividad de cinasa de tirosina. La unión del ligando induce la dimerización de moléculas receptoras y la autofosforilación en residuos de tirosina, lo que crea sitios de unión para diferentes proteínas con actividad enzimática, como la fosfolipasa C γ (PLC γ), la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la proteína activadora de GTPasa (GAP), cinasas de tirosina de la familia Src (Src, Yes y Fyn), y fosfatasa de tirosina (SHP1 y SHP2) o para proteínas adaptadoras, como Shc, Grb2, Crk, Nck, Cbl y Gab1. La autofosforilación de residuos específicos del dominio citoplásmico determina la interacción del receptor con secuencias particulares de las proteínas blanco, que se conocen como dominios SH2, SH3 y PH, debido a la homología de su secuencia con la región no catalítica de la cinasa de tirosina Src y de la proteína plectrina, respectivamente (Schlessinger y Ulrich, 1992; Galisteo y col., 1995; Pawson, 1995).

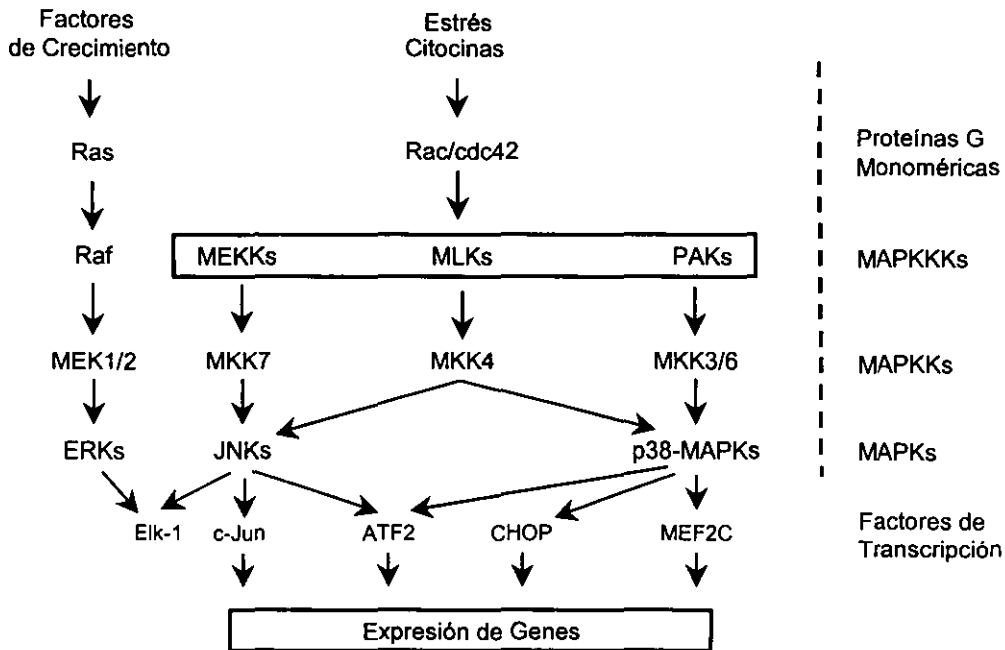


Fig. 4 Esquema de las Cascadas de Activación de las Cinasas Activadas por Mitógeno. MAPKKKs (MAPK o ERKcinasas cinasas); MAPKKs (MAPK cinasas); MLKS (cinasas de origen mezclado; PAKs (p21 cinasas activadas)

La transducción de la señal del receptor es iniciada por la activación de la GTPasa monomérica, Ras. La activación de Ras es precedida por la unión al receptor de la proteína adaptadora Shc, que al ser fosforilada en un residuo de tirosina se asocia a un complejo formado por una segunda proteína adaptadora (Grb2) y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras (Sos). El complejo Grb2-Sos se asocia a la membrana plasmática, en donde Sos promueve el intercambio de GDP por GTP en Ras. La proteína Ras activa (Ras-GTP) interactúa con la serina/treonina cinasa Raf-1, previamente activada por translocación a la membrana. La cinasa Raf-1 fosforila y activa a MEK (MEK1/MEK2) que fosforila residuos de treonina y tirosina de ERK1/2 e incrementa su actividad enzimática. Las ERKs modulan la actividad de enzimas (PLA₂, cinasa ribosomal S6) o se translocan al núcleo, en donde fosforilan factores de transcripción que controlan la expresión de genes específicos (Schlessinger y Ulrich 1992).

Varias respuestas inducidas por los receptores de EGF y PDGF son mediadas por los fosfoinosítidos generados como resultado de la asociación al receptor y activación de las enzimas PLC γ y PI3K. La PLC γ cataliza la hidrólisis de PIP₂ y produce IP₃ y DAG, que incrementan el nivel de Ca²⁺ intracelular y la actividad de la PKC, respectivamente. La interacción de la subunidad reguladora (p85) de la PI3K con el receptor y el aumento en la actividad de la subunidad catalítica de la enzima promueve la fosforilación de PIP₂ y produce PI(3,4,5)P₃, que al ser desfosforilado por una fosfatasa específica da lugar a PI(3,4)P₂. Ambas moléculas pueden actuar como segundos mensajeros de las respuestas mediadas por la PI3K (Rhee y Bae, 1997; Rameh y Cantley, 1999).

Las PI3Ks son enzimas que catalizan la fosforilación de fosfolípidos en la posición 3 del anillo inositol. De acuerdo a su estructura y especificidad por el sustrato se agrupan en tres clases. Las PI3Ks de la **clase I** son heterodímeros compuestos de una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110) e incluyen a las isoenzimas PI3K α , PI3K β , y PI3K δ (**clase I_A**) que intervienen en la transducción de las señales de los receptores con actividad de cinasa de tirosina. Otro miembro identificado es la PI3K γ (**clase I_B**), constituida por una subunidad adaptadora (p101) y una subunidad catalítica (p110 γ), que es activada por el complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas e interviene en las respuestas mediadas por los receptores acoplados a proteínas G. Aunque estas cinasas son capaces de fosforilar "*in vitro*" a PtdIns (PI), PI(4)P y PIP₂, actúan selectivamente sobre el PIP₂ "*in vivo*". Las PI3Ks de la **clase II** (PI3KC2 α y PI3KC2 β) son monómeros de 170-210 kDa que fosforilan a PI y PI(4)P. Por su parte, la cinasa de la **clase III** es un heterodímero formado por las subunidades reguladora (p101) y catalítica (p150) y utiliza como sustrato únicamente al PI (Stoyanov y col., 1995; Stephens y col., 1997; Rameh y Cantley, 1999).

Se ha demostrado que los receptores acoplados a proteínas G utilizan moléculas efectoras similares a las de los receptores con actividad de cinasa de tirosina para la transducción de señales mitogénicas (Gutkind, 1998).

Dependiendo del tipo celular y de la proteína G activada, los receptores acoplados a proteínas G pueden utilizar diferentes vías para estimular a las ERKs. Por ejemplo, en células COS y fibroblastos la activación de las ERKs inducida por diferentes receptores acoplados a G_i (α_{2A} -adrenérgicos, muscarínicos m₂, dopaminérgicos D₂, A₁ de adenosina y del ácido lisofosfatídico) se correlaciona con el incremento en la fosforilación en tirosina de la proteína adaptadora Shc, asociación subsecuente con el complejo Grb2-Sos, activación de Ras y estimulación de la cascada Raf/MEK/ERK. Estas respuestas aparentemente son iniciadas por el complejo $\beta\gamma$ liberado de la proteína G_i, ya que la sobreexpresión de $\beta\gamma$ induce la fosforilación de Shc y la activación de las ERKs. Además, la expresión de un péptido derivado del carboxilo terminal de la GRK2 (β ARK1_{ct}), que une y secuestra a los dímeros $\beta\gamma$ libres, inhibe la fosforilación de Shc y la activación de las ERKs inducida por los receptores α_{2A} -adrenérgicos y muscarínicos m₂, en células COS-7 y del ácido lisofosfatídico en este sistema y en células Rat-1. La fosforilación en tirosina y activación de Shc mediada por $\beta\gamma$ parece ser uno de los eventos iniciales en la vía de activación de la cascada de las ERKs, que utilizan diferentes receptores acoplados a G_i (van Corven, 1993; Crespo y col., 1994; Koch y col., 1994; Hordijk y col., 1994; Faure y col., 1994; van Biesen y col., 1995; Touhara y col., 1995; Ito y col., 1995; Luttrell y col., 1996).

Varios estudios indican la participación de cinasas de tirosina de la familia Src en la activación de la proteína Shc. La fosforilación de Shc y la formación subsecuente del complejo Shc-Grb2-Sos, mediada por la sobreexpresión de $\beta\gamma$ o por la estimulación de los receptores de trombina, del ácido lisofosfatídico, muscarínicos m₂ y α_2 -adrenérgicos son bloqueadas por la inhibición de cinasas de tirosina de la familia Src. La estimulación de estos receptores incrementa la autofosforilación y activación de la cinasa Src y la respuesta es inhibida por la sobreexpresión de una mutante dominante negativa de Src o de la cinasa Csk, que regula negativamente a las cinasas de la familia Src. Esto sugiere que Src o alguna cinasa relacionada (Lyn, Fyn, Syk o Yes), pueden fosforilar a Shc en respuesta a la señal mediada por las

subunidades $\beta\gamma$ (van Corven y col., 1993; Chen y col., 1994; Luttrell y col., 1996; Wan y col., 1996; Della Rocca y col., 1997).

Se ha sugerido que la PI3K γ actúa como intermediario en la activación de Src inducida por el complejo $\beta\gamma$. La PI3K γ , ya sea directamente o mediante el PIP₃ formado, es capaz de unirse a los dominios SH2 y SH3 de las cinasas Src y activarlas (Touhara y col., 1995; Stoyanov y col., 1995; Hawes y col., 1996; Lopez-Illasaca y col., 1997).

A partir de esta información se ha propuesto un modelo para la estimulación de las ERKs producida por los receptores acoplados a la proteína G_i. El receptor activado promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad G α_i y la disociación del complejo $\beta\gamma$. El dímero $\beta\gamma$ liberado puede activar a la PI3K γ , que estimula a las cinasas Src y favorece la formación del complejo Shc-Grb2-Sos, activación de Ras y estimulación de la cascada Raf/MEK/ERKs (Hawes y col., 1996; Luttrell y col., 1996; Lopez-Illasaca y col., 1997).

Los receptores acoplados a la proteína G_{q/11} utilizan distintas vías para la regulación de las ERKs, cuya especificidad depende del ambiente celular. Por ejemplo, los receptores α_{1B} -adrenérgicos y muscarínicos m₁ transfectados en células COS y CHO utilizan una vía independiente de Ras que es mediada por la subunidad α de las proteínas G_{q/11} (G $\alpha_{q/11}$) y dependiente de la PKC. La activación de ERK1/2 es inhibida por la expresión de una mutante dominante negativa de Raf-1 y por la disminución en la concentración celular de PKC, pero no es modificada por una mutante dominante negativa de Ras. Una vía similar se ha descrito para la estimulación de ERKs por los receptores AT₁ en miocitos cardiacos. Puesto que Raf-1 puede ser fosforilada directamente por la PKC, ésto representa un mecanismo potencial para la activación de ERK1/2. Sin embargo, existen reportes de que la activación de las ERKs puede ser sólo parcialmente o totalmente independiente de la PKC. Esto probablemente se debe a las múltiples interacciones moduladoras que ejercen diferentes isoenzimas de la PKC en la vía de las ERKs (Kolch y col., 1993; Faure y col., 1994; Hawes y col., 1995; van Biesen y col., 1996; Zou y col., 1996; Schönwasser y col., 1998).

En células HEK-293 los receptores α_{1B} -adrenérgicos activan a ERK1/2 por una vía que incluye la estimulación de la PLC β por G $\alpha_{q/11}$, la activación de las cinasas Src y en la que participa Ras. La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de Src o de la cinasa Csk inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por el receptor. Como se mencionó anteriormente la fosforilación de Shc catalizada por las cinasa Src es un evento importante en la activación de Ras y estimulación subsecuente de la cascada Raf/MEK/ERKs. Distintos miembros de la familia de cinasas Src (Src, Fyn, Lyn o Syk) se han sugerido como intermediarios en la estimulación de ERKs por algunos receptores acoplados a la proteína G_{q/11} (Chen y col., 1994; Wan y col., 1996; Sadoshima e Izumo, 1996; Simonson y col., 1996; Dickic y col., 1996; Della Rocca y col., 1997).

Otra cinasa que puede intervenir en la transmisión de la señal del receptor a la cascada de las ERKs es la cinasa de tirosina Pyk2. Esta enzima es activada en respuesta a la activación de distintos receptores o a estímulos que aumentan el nivel de calcio intracelular y/o que activan a la PKC. La Pyk2 forma un complejo con la cinasa Src, que se une al sitio principal de autofosforilación de Pyk2 (Tyr⁴⁰²) e induce la fosforilación de uno o más residuos de tirosina,

lo que aumenta la actividad de Pyk2 y crea sitios de unión para la proteína adaptadora Grb2. De esta forma, Pyk2 puede directa o indirectamente, mediante la fosforilación de Shc, reclutar al complejo Grb2-Sos a la membrana plasmática en donde se localiza Ras. Esta enzima interviene en la estimulación de ERKs inducida por los receptores α_{1B} -adrenérgicos en células HEK-293, de bradicinina en células PC12, AT_1 en células de músculo liso vascular y de endotelina en astrocitos (Lev y col., 1995; Dickic y col., 1996; Della Roca y col., 1997; Cazaubon y col., 1997; Sabri y col., 1998; Blaukat y col., 1999).

Diferentes mecanismos de regulación y distinto nivel de acoplamiento a la vía de ERKs también se han demostrado entre los subtipos de receptores adrenérgicos. En células NIH3T3 transfectados con cada uno de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, la estimulación de los receptores α_{1A} y α_{1B} -adrenérgicos aumenta la actividad de ERK1/2, pero la respuesta no se observa en las células con el receptor α_{1D} -adrenérgico. La estimulación de las ERKs se correlaciona con la activación de Ras; la señal de los receptores α_{1B} y α_{1A} -adrenérgicos es transmitida por $G_{\alpha_{q/11}}$ y por el dímero $\beta\gamma$, respectivamente. Asimismo, la estimulación de estos receptores produce la activación de PI3K, que ocurre en un paso previo (receptor α_{1B}) o posterior (receptor α_{1A}) a la activación de Ras. La PI3K también interviene en las respuestas mitogénicas de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso vascular (Hu y col., 1996, 1999).

Distintas evidencias indican que la transmodulación de los receptores con actividad de cinasa de tirosina, como los de EGF y PDGF, representa un mecanismo importante para la activación de las ERKs inducida por los receptores acoplados a proteínas G. En células de músculo liso vascular la estimulación de los receptores de angiotensina II promueve la fosforilación en tirosina de los receptores de PDGF y EGF, y su asociación con la proteínas Shc y Grb2. En células Rat-1 y COS la estimulación de los receptores de endotelina, ácido lisofosfatídico o trombina aumenta la fosforilación del receptor de EGF y la actividad de ERK1/2; la respuesta es bloqueada por tratamiento con un inhibidor específico del receptor de EGF (AG1478) o por la coexpresión de una mutante dominante negativa del receptor. En células PC12 la entrada de Ca^{2+} extracelular inducida por bradicinina o por despolarización membranal contribuye de manera importante en la fosforilación del receptor de EGF y activación de las ERKs (Linseman y col., 1995; Daub y col., 1996, 1997; Rosen y col., 1996; Zwick y col., 1997; Eguchi y col., 1998; Herrlich y col., 1998).

Aún cuando no se han determinado los mecanismos que intervienen en la activación de los receptores de EGF y PDGF, se ha sugerido la participación de las cinasas Src y de PKC. La fosforilación del receptor de EGF inducida por los receptores del ácido lisofosfatídico y α_2 -adrenérgicos en células COS y por el receptor AT_1 en células de músculo liso vascular es mediada por Src. En células HEK-293 los receptores muscarínicos m_1 activan al receptor de EGF por un mecanismo dependiente de PKC. Sin embargo, varios estudios indican que la PKC regula negativamente al receptor, lo que sugiere que isoformas específicas de PKC pueden contribuir de manera diferente en la modulación del receptor (Luttrell y col., 1997; Tsai y col., 1997; Zwick y col., 1997; Eguchi y col., 1998; Li y col., 1998).

JUSTIFICACION

La desensibilización es un proceso fundamental para la regulación de la actividad de los receptores adrenérgicos. En comparación con el sistema β -adrenérgico, existe poca información de los mecanismos moleculares que participan en la desensibilización de los receptores α_1 -adrenérgicos.

La primera evidencia que indica un papel importante de la PKC en la regulación de la actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos se obtuvo de la demostración de que el tratamiento con TPA bloquea las acciones mediadas por estos receptores en hepatocitos de rata (Corvera y García-Sáinz, 1984; Corvera y col., 1986). Esto fue confirmado en células DDT1 MF-2, en las que la inhibición de la respuesta se acompañó de la fosforilación del receptor (Leeb-Lundberg y col., 1985, 1987).

Si bien los receptores α_1 -adrenérgicos se acoplan a la misma vía de transducción de la señal, existen diferencias funcionales entre los distintos subtipos de receptores. Se ha reportado que el subtipo α_{1A} se acopla más eficientemente a la PLC β y produce un nivel de respuesta mayor, que el subtipo α_{1B} -adrenérgico (Schwinn y col., 1991). Esta variabilidad también parece operar en la regulación de la actividad de los subtipos de receptores. El grado de desensibilización inducida por la activación de PKC con TPA es mayor en los hepatocitos de rata (que expresan el subtipo α_{1B}), respecto al de los hepatocitos de cobayo (que expresan el subtipo α_{1D}) y de conejo (que expresan el subtipo α_{1A}). En fibroblastos Rat-1 transfectados con cada uno de los subtipos de receptores se observa que el subtipo α_{1D} es el más sensible y el subtipo α_{1A} es el menos sensible al efecto bloqueador del TPA (García-Sáinz y Macías-Silva, 1995; Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996).

Aún cuando estos datos indican la participación de la PKC en la desensibilización homóloga de los receptores α_1 -adrenérgicos, los datos no son concluyentes. Por ejemplo, existen reportes de que la estimulación aguda con TPA produce la fosforilación y desensibilización homóloga del receptor y que la PKC fosforila a los receptores α_1 -adrenérgicos "*in vitro*" (Leeb-Lundberg y col., 1985, 1987; Bouvier y col., 1987). Sin embargo, la disminución en la concentración celular de PKC o el bloqueo de su actividad por el tratamiento con el inhibidor Ro-318220, no modifica la desensibilización inducida por la estimulación con el agonista (Lattion y col., 1994; Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996), esto sugiere que en este sistema la desensibilización inducida por el agonista puede requerir de la participación de isoenzimas de la PKC que son insensibles a la activación por TPA o de otro tipo de cinasas.

El **objetivo** de esta tesis fue estudiar los mecanismos que intervienen en la regulación heteróloga del receptor α_{1B} -adrenérgico, utilizando como sistema modelo fibroblastos Rat-1 transfectados con el receptor. En particular se investigó la contribución de la PKC y la posible participación de otras cinasas en la fosforilación y desensibilización del receptor α_{1B} -adrenérgico, inducida por la activación de diferentes receptores presentes endógenamente en las células Rat-1.

HIPOTESIS

La actividad de los receptores α_{1B} -adrenérgicos puede ser modulada por receptores acoplados a las proteínas G y por receptores con actividad de cinasa de tirosina. Las señales desencadenadas por estos receptores aumentan el nivel de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico e inducen su desensibilización. La PKC contribuye de manera importante en la regulación heteróloga del receptor adrenérgico.

**La Activación de los Receptores ET_A de Endotelina Induce la Fosforilación
de los Receptores α_{1B} -Adrenérgicos en Fibroblastos Rat-1 (*)**

**(*) Trabajo Publicado en: *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*.
(1997), 272 (43): 27330-27337**

Activation of Endothelin ET_A Receptors Induces Phosphorylation of α_{1b} -Adrenoreceptors in Rat-1 Fibroblasts*

José Vázquez-Prado‡, Luz del Carmen Medina‡§, and J. Adolfo García-Sáinz‡¶

From the ‡Department of Cell Biology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, México, D. F. 04510 and the §Department of Biology of Reproduction, División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Michoacán y Purísima, México, D. F. 09340

The effect of endothelin-1 on the phosphorylation of α_{1b} -adrenoreceptors, transfected into rat-1 fibroblasts, was studied. Basal α_{1b} -adrenoreceptor phosphorylation was markedly increased by endothelin-1, norepinephrine, and phorbol esters. The effect of endothelin-1 was dose dependent ($EC_{50} \approx 1$ nM), reached its maximum 5 min after stimulation, and was inhibited by BQ-123, an antagonist selective for ET_A receptors. Endothelin-1-induced α_{1b} -adrenoreceptor phosphorylation was attenuated by staurosporine or genistein and essentially abolished when both inhibitors were used together. The effect of norepinephrine was not modified by either staurosporine or genistein alone, and it was only partially inhibited when both were used together. These data suggest the participation of protein kinase C and tyrosine kinase(s) in endothelin-1-induced receptor phosphorylation. However, phosphoaminoacid analysis revealed the presence of phosphoserine and traces of phosphothreonine, but not of phosphotyrosine, suggesting that the putative tyrosine kinase(s), activated by endothelin, could act in a step previous to receptor phosphorylation. The effect of endothelin-1 on α_{1b} -adrenoreceptor phosphorylation was not mediated through pertussis toxin-sensitive G proteins. Calcium mobilization induced by norepinephrine was diminished by endothelin-1. Norepinephrine and endothelin-1 increased [³⁵S]GTPγS binding to control membranes. The effect of norepinephrine was abolished in membranes obtained from cells pretreated with endothelin-1. Interestingly, genistein plus staurosporine inhibited this effect of the endothelial peptide. Endothelin-1 did not induce α_{1b} -adrenoreceptor internalization. Our data indicate that activation of ET_A receptors by endothelin-1 induces α_{1b} -adrenoreceptor phosphorylation and alters G protein coupling.

α_{1b} -Adrenoreceptors (α_{1B} -ARs)¹ belong to the seven transmembrane domains G protein-coupled family of receptors that modulate phosphoinositide turnover (for reviews, see Refs. 1–3). Uppercase (α_{1B}) is used when referring in general to this subtype or to receptors characterized pharmacologically in cells or tissues that naturally express them, and lowercase (α_{1b}) is used exclusively, when referring to cloned receptors, as suggested by the International Union of Pharmacology (IUPHAR) (4). It is generally accepted that their function and cellular distribution (internalization/recycling) are, at least partially, regulated by phosphorylation/dephosphorylation processes. The roles that different serine-threonine kinases specific for G protein-coupled receptors (GRKs) and second messenger-regulated kinases (like protein kinase A and PKC) play in such events have been extensively studied but remain yet only partially known, and some aspects of their function are still controversial (for reviews, see Refs. 5 and 6). The complexity of the problem of assigning roles to specific isoforms is exemplified by the ability of messenger-regulated kinases to modulate the activity of GRKs (crosstalk) (reviewed in Ref. 7).

*This research was partially supported by a grant from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN 200596). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence and requests for reprints should be addressed: Inst. Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-248, México, D. F. 04510. Tel.: 525-622-5612; Fax: 525-622-5613; E-mail: agarcia@ifcsun1.ifsiol.unam.mx.

¹ The abbreviations used are: α_{1b} -AR, α_{1b} -adrenergic receptor; ET-1, endothelin-1; TPA, tetradecanoylphorbol acetate; GRK, G protein-coupled receptor kinase; PTX, pertussis toxin; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; Gpp(NH)p, guanylylimidodiphosphate; EGF, epidermal growth factor; GTPγS, guanosine 59-O-(3-thiotriphosphate).

Phosphorylation of α_{1B} -ARs seems to be a key regulatory step for the shutdown of their function and takes place in the presence of agonist or after the activation of second messenger-regulated kinases, such as PKC (8-12). Activation of PKC with phorbol esters blocks α_{1B} -adrenergic actions in cells that naturally express this subtype, such as hepatocytes (13-16) and DDT1 MF2 smooth muscle cells (8). Likewise, such effect has been observed in cells transfected with this receptor subtype (9, 10, 17). GRK2 and GRK3 have been involved in homologous desensitization of α_{1B} -AR in COS-7 cells cotransfected with both the receptor and the kinases (10).

On the other hand, in rat-1 fibroblasts, endothelin increases IP₃ production and activates PKC (18). Interestingly, many other signaling processes are also activated by this endothelial peptide. Thus, endothelin inhibits adenylyl cyclase through pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins, turning off the activity of protein kinase A (19, 20). It also stimulates the phosphorylation of several proteins in tyrosine residues and activates the mitogen-activated protein kinase pathway in rat-1 fibroblasts and other cell types (19-21). The expression of *c-fos* and other cellular responses induced by activation of endothelin receptors involve stimulation of *c-src* (22). Focal adhesion kinase is phosphorylated in cells responding to endothelin (23, 24). Rho-mediated endothelin-1 stimulation of phospholipase D in rat-1 fibroblasts has also been recently reported (25).

The ability of endothelin receptors to elicit activation of different cellular pathways allows them to influence the activity of other receptors present in the same cell. Recently, it has been elegantly demonstrated that ET-1 transmodulates positively the activity of epidermal growth factor receptors in rat-1 fibroblasts (26). In this study, it was observed that activation of ET_A receptors elicited phosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptors and its association with Grb-2 and Shc; i.e. ET-1 induces the activation of EGF receptors in the absence of its ligand (26).

In previous studies, we demonstrated that tetradecanoylphorbol acetate (TPA) attenuates the action of α_{1B} -ARs transfected into rat-1 fibroblasts (17). It has already been demonstrated that in these cells, activation of PKC by phorbol esters results in the phosphorylation of this transfected receptor (9, 10). In the present work, the effect of activation of endothelin ET_A receptors (that are endogenously expressed in rat-1 cells) on the phosphorylation of α_{1B} -ARs was examined. Since it is known that ET-1 induces activation of tyrosine kinases in rat-1 cells, the signaling pathways that participate in such effect were explored.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—(-)-Norepinephrine, endothelin, TPA, prazosin, DL-propranolol, staurosporine, wortmannin, guanylylimidodiphosphate (Gpp(NH)p), GDP, and protease inhibitors were obtained from Sigma Chemical Co. Phentolamine was a generous gift from Ciba-Geigy. BQ-123 and genistein were from Research Biochemicals Inc. EGF, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from Life Technologies, Inc. Aryl-¹²⁵I-azidoprazosin (2200 Ci/mmol), [³H]prazosin (77.9 Ci/mmol), [³⁵S]GTPγS (1250 Ci/mmol), [³²P]NAD⁺ (800 Ci/mmol), and [³²P]P_i (8500-9120 Ci/mmol) were from NEN Life Science Products. Sepharose-coupled

protein A was from Upstate Biotechnology. Fura-2/AM was from Molecular Probes. PTX was purified from vaccine concentrates as described (27). The carboxyl-terminal peptide of the α_{1b} -AR was obtained from Multiple Peptide Systems. Polyvinylidenedifluoride membranes were obtained from Bio-Rad.

Cell Lines and Culture—Rat-1 fibroblasts transfected with the hamster α_{1b} -AR (28), 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 of the neomycin analog per ml, G-418 sulfate, 100 μ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B at 37 °C under a 95% air/5% CO₂ atmosphere as described previously (17). In the present experiments, cells at confluence were serum deprived in unsupplemented DMEM for 24 h.

Photoaffinity Labeling of the α_{1b} -AR—Membranes (100 μ g) from rat-1 cells expressing α_{1b} -AR (2-2.5 pmol/mg protein), prepared as described previously (17), were incubated in the dark with 6 nM aryl-¹²⁵I-labeled azidoprazosin essentially as described by Lattion *et al.* (9) for 1 h at room temperature; then 1 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA containing protease inhibitors (leupeptin 20 μ g/ml, aprotinin 20 μ g/ml, phenylmethylsulfonyl fluoride 100 μ g/ml, bacitracin 500 μ g/ml, and soybean trypsin inhibitor 50 μ g/ml) was added, and the tubes were exposed to UV light for 3 min. After this treatment, membranes were centrifuged at 12,700 \times g for 15 min, washed, and electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. The specificity of the labeling was determined using phentolamine or prazosin as competitors.

Immunoprecipitation of α_{1b} -AR—Immunoprecipitation of α_{1b} -AR was standardized using photoaffinity-labeled membranes. Rabbit antiserum against the decapeptide of the carboxyl terminus sequence of the hamster α_{1b} -AR was obtained by immunizing rabbits with the indicated peptide coupled to keyhole limpet hemocyanin. Serum samples with a titer above 1:5000, as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (peptide), were used. Membranes were solubilized with 1 ml of solubilization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 0.05% SDS, 50 mM NaF, 100 mM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phosphoserine, 1 mM phosphothreonine, and the previously mentioned protease inhibitors at the concentrations indicated) for 1 h at 4 °C; the extracts were centrifuged at 12,700 \times g for 15 min at 4 °C, and the supernatants were transferred to new tubes containing 10 μ l of immune serum and 40 μ l of Sepharose-coupled protein A (1:1 (v/v) slurry). Tubes were incubated overnight at 4 °C. Beads were washed five times (1 ml/each) with 50 mM Hepes, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.2, containing 1.0% Triton X-100, 0.05% SDS, and 100 mM NaF; once with 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4; and once with 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4. Washed beads were boiled in 100 μ l of Laemmli sample buffer containing 5% mercaptoethanol and electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide minigels, transferred to nitrocellulose, and exposed to X-Omat x-ray film (Eastman Kodak Co.) at -80 °C with an intensifying screen. Autoradiographs were analyzed with the Collage software, version 2.0.

Phosphorylation of α_{1b} -AR—Rat-1 fibroblasts expressing the α_{1b} -AR were grown to confluence in 10-cm culture dishes and serum starved for 24 h. On the day of the experiment, cells were maintained in phosphate-free DMEM during 1 h and then incubated in 3 ml of the same medium containing [32 P]P_i (0.05 mCi/ml) for 3 h at 37 °C. Labeled cells were stimulated with ET-1, norepinephrine, EGF, or TPA as indicated; then they were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and solubilized with 1.0 ml of ice-cold solubilization buffer. The plates were maintained for 1 h on ice; then the extracts were centrifuged at 12,700 × g for 15 min, at 4 °C, and the supernatants were transferred to new tubes containing 10 µl of anti- α_{1b} -AR antiserum and 40 µl of Sepharose-coupled protein A and immunoprecipitated as described above. The effect of staurosporine, genistein, and wortmannin on the phosphorylation of α_{1b} -AR was assayed by preincubating these agents in labeling medium for the time and concentrations indicated in the figures. The amount of phosphorylated receptor was determined by densitometric analysis of autoradiographs or by PhosphorImager analysis. At least three independent experiments were performed for each treatment. Data were analyzed and plotted using commercial software (Prism 2.01, GraphPad Software).

PTX Treatment of the Cells—Transfected rat-1 fibroblasts, in 10-cm dishes, were incubated for 16-24 h with or without PTX (100 ng/ml). The presence of PTX was continued throughout the phosphorylation period. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation was carried out as described previously (29).

Phosphoaminoacid Analysis—Immunoprecipitated phosphorylated receptors were transferred to polyvinylidene difluoride membranes and hydrolyzed in 0.2 ml of 6 N HCl at 110°C for 1.5 h. Samples were then centrifuged at 12,700 × g for 5 min, and the acid supernatants were evaporated to dryness in a vacuum concentrator (Speed Vac). Hydrolyzed samples were solubilized in a mixture of cold phosphoaminoacid standards (Ser(P), Thr(P), and Tyr(P), 25 nmol each) and analyzed by two dimensional thin layer cellulose electrophoresis, using 750 V for each dimension (30).

Membrane Preparation and [35 S]GTP γ S Binding—Overnight serum-deprived confluent cultures were treated with the different agents to be tested, washed, and scraped with a rubber policeman in buffer containing 20 mM Hepes, pH 7.5, 5 mM EDTA, 100 µM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM MgCl₂, and the previously mentioned protease inhibitors at the concentrations indicated. Membranes were prepared according to the method of Mattingly *et al.* (31) and resuspended in binding buffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.5). [35 S]GTP γ S binding was performed as described by Wieland and Jakobs (32) with minor modifications. In brief, membranes were preincubated in binding buffer supplemented with 100 µM Gpp(NH)p, 100 µM GDP, and 1 mM dithiothreitol for 30 min at 30 °C in a shaking water bath. After this preincubation, membranes were washed and resuspended in binding buffer without nucleotides. The binding reaction was carried out in a volume of 250 µl for 30 min at 30 °C in the same buffer containing 0.2 nM [35 S]GTP γ S. The reaction was initiated by the addition of membranes (25 µg of protein/tube) and terminated by the addition of 2 ml of ice-cold binding buffer without EDTA and filtration on Whatman GF/C filters using a Brandel harvester. Nonspecific binding was determined in the presence of 100 µM Gpp(NH)p and represented \approx 10% of total binding. Filters were washed three times and dried, and radioactivity was measured with a

liquid scintillation counter. Statistical analysis between comparable groups was performed using analysis of variance with Newman-Keuls analysis.

[Ca²⁺]_i Measurements—Confluent fibroblasts were incubated overnight in DMEM without serum and antibiotics. Cells were loaded with 5 μM 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 (17). Fluorescence measurements were carried as described, but the excitation monochromators were set at 340 and 380 nm, with a chopper interval of 0.5 s, and the emission monochromator was set at 510 nm. [Ca²⁺]_i was calculated according to the method of Grynkiewicz *et al.* (33) using the software provided by AMINCO-Bowman; traces were directly exported to the graphs.

Surface Receptors—Intact cell receptor binding assays were performed as described by Diviani *et al.* (10) by incubating cell monolayers grown in 24-well clusters containing 1 nM [³H]prazosin. Incubation was at 4 °C for 12-15 h. After binding, cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline, scraped, and counted. Phentolamine (10 μM) was used to determine nonspecific binding which was ≈ 10% of total binding.

RESULTS

Photoaffinity Labeling and Immunoprecipitation of the α_{1b}-AR—A polyclonal rabbit antibody directed against the last 10 amino acids of the hamster α_{1b}-AR carboxyl terminus was generated and used for immunoprecipitation. To define that the receptor was immunoprecipitated, membranes where the receptor was labeled by photoaffinity cross-linking with aryl-¹²⁵I-azidoprazosin were used. Photoaffinity labeling of the rat-1 membranes resulted in a major band with a molecular weight of ≈ 85,000 (Fig. 1a), which is within the expected size for the α_{1b}-AR (9, 10). As anticipated, the labeling was blocked with phentolamine (Fig. 1a) and prazosin (data not shown), confirming the identity of the receptor. Other minor bands were also observed after prolonged exposure of the gels: a band of high molecular weight (>150,000), which may correspond to aggregates of receptors or oligomers (34); and two other faint bands with molecular weights of ≈ 40,000 and ≈ 25,000. These later two bands do not seem to correspond to the receptor since they were also observed when the labeling was performed in the presence of phentolamine (Fig. 1a). Fig. 1b shows that the α_{1b}-AR is immunoprecipitated from aryl-¹²⁵I-azidoprazosin-labeled membranes; the procedure was very reproducible and most efficient when the incubation with the antibody was performed overnight at 4 °C (70-80% of the labeled receptor was immunoprecipitated under these conditions; range of 3 determinations in 3 experiments using different membrane preparations) compared with 1 h at the same temperature (Fig. 1b). Coimmunoprecipitation of the high molecular weight band and of the nonspecific band with a molecular weight of ≈ 40,000 was observed in some of the experiments. No immunoprecipitation of α_{1b}-AR was detected when preimmune serum was used as control in the same conditions under which a maximum efficiency was achieved with immune serum (Fig. 1b). Antiserum against α_{1b}-AR identified the receptor in Western blots of membranes obtained from α_{1b}-AR-transfected rat-1 fibroblasts but no signal was detected in membranes from α_{1a}-AR-transfected cells (data not shown).



FIG. 1. Photoaffinity labeling and immunoprecipitation of the α_{1b} -AR. In *a*, membranes from transfected rat-1 fibroblasts were labeled with aryl- ^{125}I -azidoprazosin (^{125}I -azido-pz) in the absence (-) or presence (+) of 10 μM phentolamine (*phent*). A representative autoradiograph of five performed with similar results is presented. *b*, aryl- ^{125}I -azidoprazosin-labeled membranes (*membranes*) were solubilized, and the α_{1b} -AR immunoprecipitated as described under "Experimental Procedures"; the immunoprecipitation was optimized by evaluating different conditions including buffers, incubation times, and quantity of protein A used; as an example, the evaluation of different amounts of Sepharose-coupled protein A (*protein A*, μl of a 1:1 (v/v) slurry) and two incubation times (16 and 1 h) are shown; as a control, preimmune serum was used (*pre-imm*). A representative autoradiograph of at least three independent experiments is shown.

α_{1b} -AR Phosphorylation—It can be observed in Fig. 2 that a labeled band with a molecular weight of $\approx 85,000$ was immunoprecipitated from rat-1 cells metabolically labeled with radioactive phosphate. Such basal receptor phosphorylation was markedly increased in cells treated for 5 min with 10 μM norepinephrine, 10 nM ET-1, or 1 μM TPA. The ET-1-stimulated α_{1b} -AR phosphorylation took place very rapidly, reaching its maximum at 5 min (Fig. 3, *a* and *b*) and gradually decreasing afterward. The effect was dependent on the concentration of ET-1 used, with an apparent EC_{50} of ≈ 1.3 nM (Fig. 4, *a* and *b*). The stimulation of α_{1b} -AR phosphorylation by 10 nM ET-1 was inhibited in a concentration-dependent fashion by BQ-123 (Fig. 4, *d* and *e*), a selective ET_A receptor antagonist ($\text{IC}_{50} \approx 235$ nM, $K_i \approx 25$ nM). The K_i obtained is within what has been observed for ET_A receptors (35), which is the subtype present in rat-1 cells (36). No effect of the antagonist on the basal phosphorylation of the α_{1b} -AR was detected (data not shown). The action of norepinephrine was also dose dependent, showing an apparent EC_{50} of 25 nM; the effect of norepinephrine was of a smaller magnitude than that of ET-1 (Fig. 4, *a* and *c*) but had a very similar time course (Fig. 3, *a* and *b*).

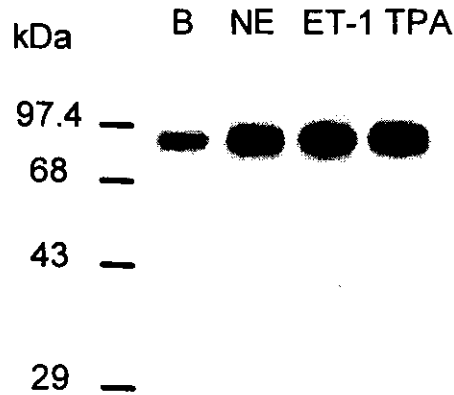


FIG. 2. Effects of norepinephrine, ET-1, and TPA on α_{1b} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P $_i$ and incubated for 5 min in the absence of any agent (B), or with 10 μ M norepinephrine (NE), 10 nM ET-1 or 1 μ M TPA. A representative autoradiograph of immunoprecipitated α_{1b} -ARs is shown. Prestained molecular weight markers (kDa) are indicated at the left.

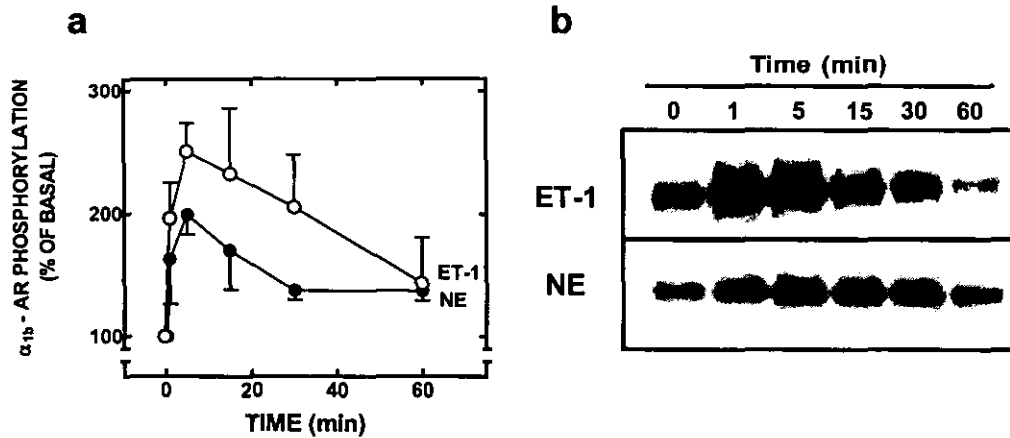


FIG. 3. Time courses of the effects of ET-1 and norepinephrine on α_{1b} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P $_i$ and incubated for the times indicated with 10 μ M norepinephrine (NE) or 10 nM ET-1. Data in a represent the mean \pm S.E. of three independent experiments in each case. Representative autoradiographs for the effects of ET-1 or norepinephrine are shown in b.

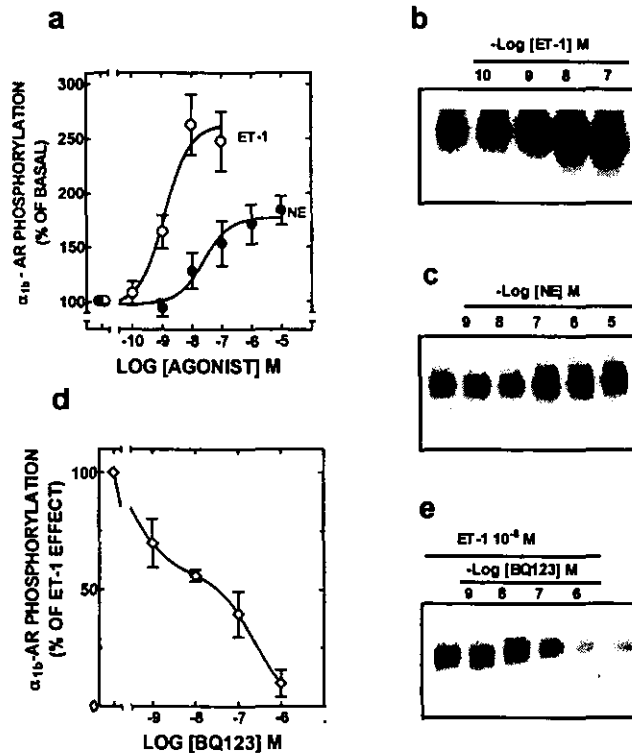


FIG. 4. Dose-response curves for the effects of ET-1 and norepinephrine on α_{1b} -AR phosphorylation and effect of the ET_A -selective antagonist, BQ-123, on the action of ET-1. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P $_i$ and incubated with the indicated concentrations of ET-1 or norepinephrine (NE) for 5 min. Data in *a* represent the mean \pm S.E. of three independent experiments; representative autoradiographs for the effects of ET-1 and norepinephrine are shown in *b* and *c*, respectively. Data in *d* represent the effect of BQ-123 on the phosphorylation of α_{1b} -AR induced by ET-1. The ET_A antagonist is preincubated for 10 min before the stimulation with ET-1. A representative autoradiograph is shown in *e*.

As indicated before, some effects of ET-1 have been reported to be mediated by activation of PKC, whereas other actions seem to involve tyrosine kinases. Therefore, we investigated the participation of these enzymes in the events that lead to the phosphorylation of the α_{1b} -AR. Preincubation of the cells with either the tyrosine kinase inhibitor, genistein, or the PKC inhibitor, staurosporine, inhibited only partially the α_{1b} -AR phosphorylation elicited by ET-1 (Fig. 5, *a*, *b*, *e*, and *f*, and Fig. 5, *c-f*, respectively). None of these inhibitors blocked the α_{1b} -AR phosphorylation induced by norepinephrine (Fig. 5, *e* and *f*). When these inhibitors were used together, they essentially abolished the phosphorylation of the α_{1b} -AR induced by ET-1 and reduced the effect of norepinephrine (Fig. 5, *e* and *f*). No effect of the inhibitors on the basal phosphorylation of the α_{1b} -AR was detected (data not shown). Wortmannin (100 nM) did not affect the α_{1b} -AR phosphorylation induced by either norepinephrine or ET-1 (Fig. 5*e*).

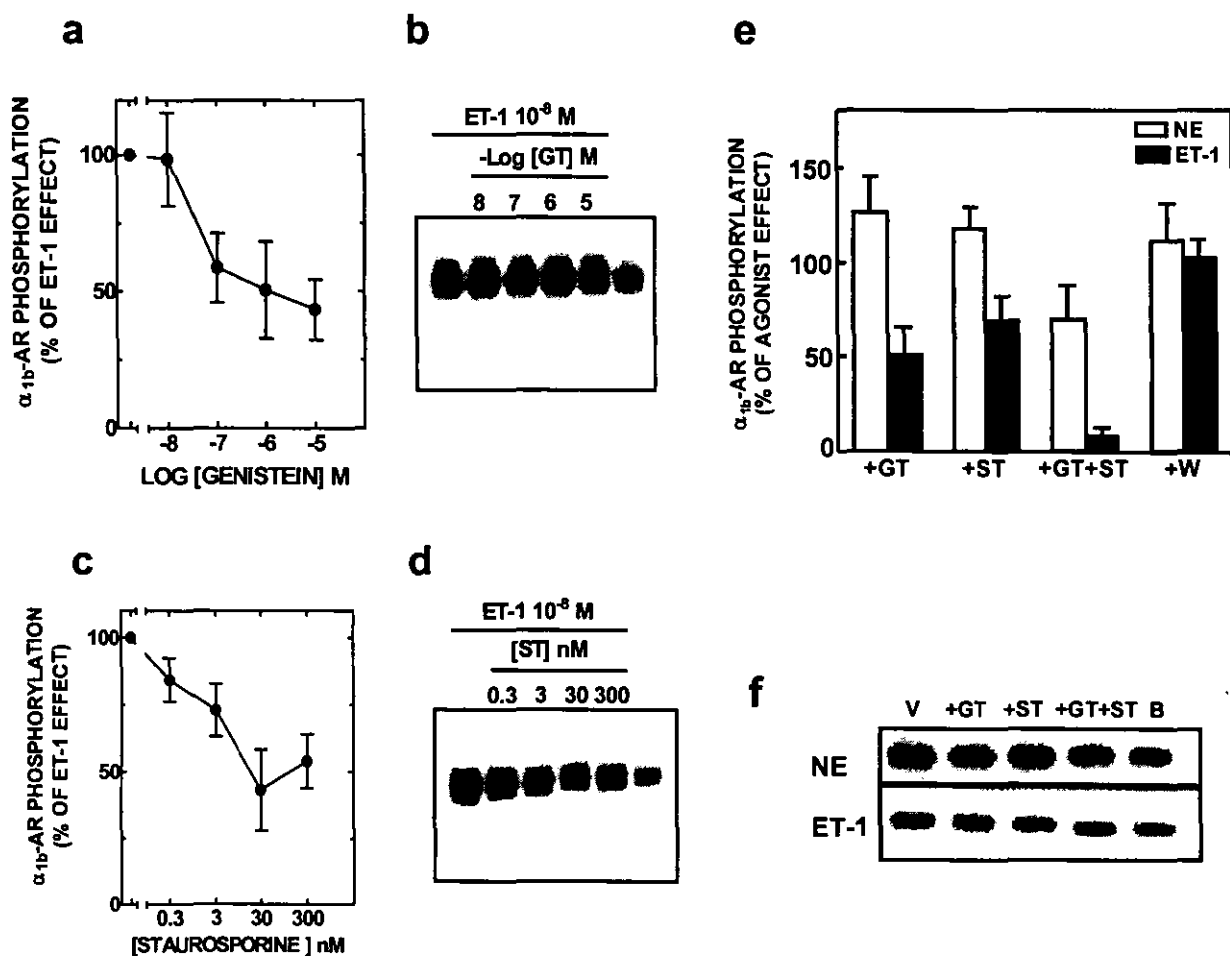


FIG. 5. Effect of genistein, staurosporine, and wortmannin on ET-1- and norepinephrine-induced phosphorylation of the α_{1b} -AR. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P_i and preincubated with the indicated concentrations of genistein (a) or staurosporine (c) for 30 min before the addition of 10 nM ET-1. Representative autoradiographs for the effects of genistein (GT) or staurosporine (ST) are shown in b and d, respectively. In both autoradiographs, a sample in which the cells were incubated without an agent is presented at the right. In e, the cells were preincubated for 30 min in the presence of 10 μ M genistein (+GT), 300 nM staurosporine (+ST), both inhibitors (+GT+ST) or 100 nM wortmannin (+W) before the addition of 10 nM ET-1 (solid bars) or 10 μ M norepinephrine (NE, open bars) for 5 min; representative autoradiographs are shown in f. Plotted data are the means \pm S.E. of 3-4 independent experiments in triplicate.

Phosphoaminoacid Analysis and Effects of PTX and EGF—To get a more clear picture of the effect of ET-1 on the phosphorylation of α_{1b} -AR, phosphoaminoacids were analyzed. It was observed that in all the experimental conditions tested Ser(P) was the major phosphoaminoacid detected with only trace amounts of label in Thr(P). We were unable to detect Tyr(P) in any of three independent experiments performed for each experimental condition (Fig. 6).

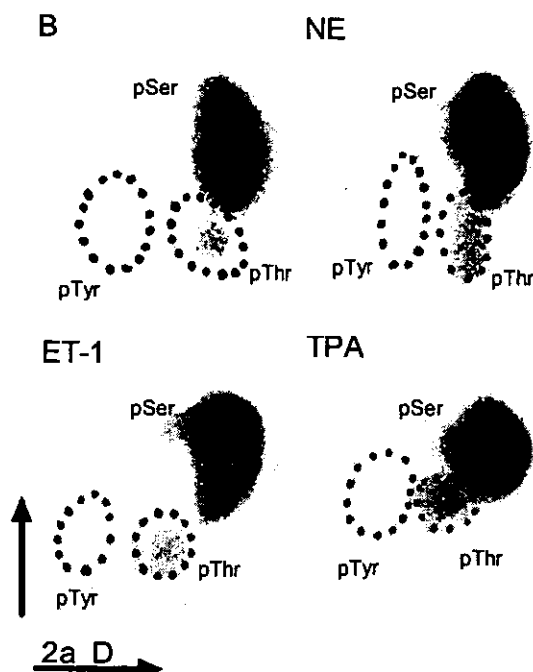


FIG. 6. Phosphoaminoacid analysis by two-dimensional separation. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P_i and incubated for 5 min in the absence of agent (B) or in the presence of 10 μ M norepinephrine (NE), 10 nM ET-1, or 1 μ M TPA. Immunoprecipitated phosphorylated receptors were transferred to polyvinylidene difluoride membranes and hydrolyzed, and phosphoaminoacids were analyzed by two dimensional thin layer cellulose electrophoresis. Representative autoradiographs are presented in which the resolutions of cold Thr(P) and Tyr(P) are indicated. ADP-ribosylation of membranes from control and PTX-treated cells is shown.

PTX-sensitive G proteins participate in some actions of ET-1 (24). Therefore, we investigated the effect of PTX pretreatment on the phosphorylation of α_{1b} -ARs induced by stimulation of endothelin receptors. For this purpose, cells were incubated in serum-free DMEM for 16-24 h with 100 ng/ml PTX, and the phosphorylation of α_{1b} -AR was assayed as before. This whole cell treatment essentially inactivated all PTX-sensitive G proteins as evidenced by the virtual absence of *in vitro* PTX-catalyzed ADP-ribosylation in membranes from toxin-treated cells (Fig. 7c). The stimulations of α_{1b} -AR phosphorylation induced by norepinephrine, ET-1 and TPA were not different in PTX-treated cells as compared with control cells (Fig. 7, a and b).

It has recently been shown that ET-1 induces tyrosine phosphorylation and activation of EGF receptors in rat-1 fibroblast (26); therefore, we tested whether the phosphorylation of α_{1b} -AR induced by activation of ET_A receptors was mediated by the EGF receptors. We were unable to observe a consistent stimulation by EGF of α_{1b} -AR phosphorylation (data not shown).

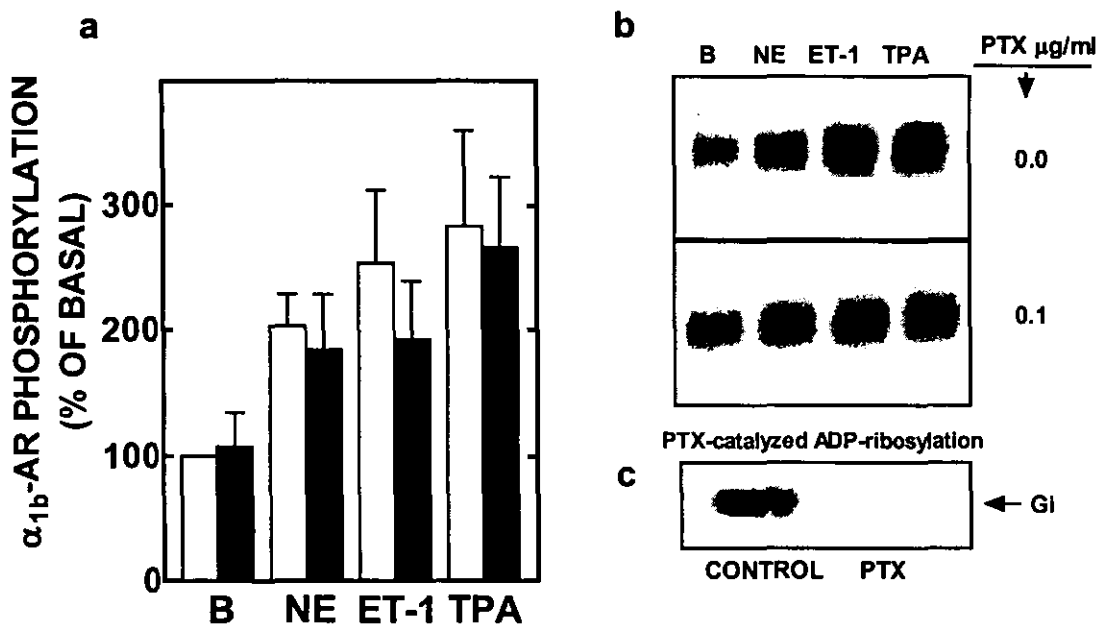


FIG. 7. Effect of PTX on ET-1-, norepinephrine-, or TPA-induced phosphorylation of the α_{1b} -AR. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were preincubated for 16-24 h in the absence (*open bars*) or presence of 0.1 $\mu\text{g/ml}$ PTX (*solid bars*) and were metabolically labeled with [^{32}P]P $_i$. Cells were incubated for 5 min in the absence of agonist (*B*) or in the presence of 10 μM norepinephrine (*NE*), 10 nM ET-1, or 1 μM TPA. Results in *a* were normalized to the amount of signal obtained in the absence of PTX and agonist (*B*, *open bar*, 100%) and plotted data represent the means \pm S.E. of three independent experiments in each case. In *b*, representative autoradiographs (α_{1b} -AR phosphorylation) are presented. In *c*, a representative autoradiograph of *in vitro* PTX-catalyzed ADP-ribosylation of membranes from control and PTX-treated cells is shown.

Functional Consequences—To obtain information on the functional consequences of ET-1-induced α_{1b} -AR phosphorylation, the effect of ET-1 on the ability of norepinephrine to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was studied. It can be observed that ET-1 increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and dose-dependently inhibited the effect of norepinephrine on this parameter (Fig. 8). However, this effect was not selective for the α_{1b} -adrenergic action since after the initial challenge with ET-1, its own action (second challenge) was also decreased; this was particularly clear when high concentrations of ET-1 were used in the first challenge (data not shown). Similarly complex was the study of the effect of ET-1 on α_{1b} -AR-mediated IP $_3$ production. ET-1 stimulated IP $_3$ production, and even after several washes the levels of this second messenger remained markedly elevated, making it difficult to evaluate the α_{1b} -adrenergic action (data not shown).

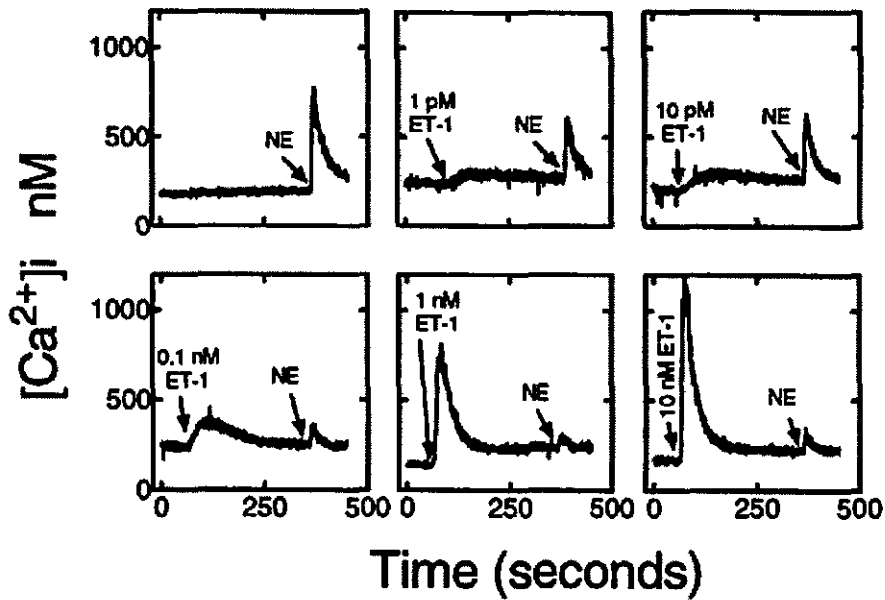


FIG. 8 Effect of ET-1 on norepinephrine-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were loaded with Fura-2/AM and $[Ca^{2+}]_i$ recorded. Traces were directly imported from the fluorometer computer. Norepinephrine (10 μ M, NE) was added 5 min after the addition of ET-1. Data are representative of 3 experiments using different cultures.

$[^{35}S]GTP\gamma S$ binding was studied to determine whether activation of ET_A receptors induces any effect on α_{1b} -AR-G protein coupling. In membranes from control fibroblasts, norepinephrine and ET-1 were clearly able to increase $[^{35}S]GTP\gamma S$ binding *in vitro* ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ versus their basal, respectively) (Fig. 9, top). When membranes from norepinephrine-treated fibroblasts were used, the catecholamine was no longer able to stimulate the binding of the radiolabeled nucleotide, and ET-1 induced a small, marginal effect (Fig. 9, top). In membranes from ET-1-treated cells, neither norepinephrine nor ET-1 induced any increase of $[^{35}S]GTP\gamma S$ binding (Fig. 9, top). Since the combination of genistein and staurosporine was able to inhibit ET-1-mediated α_{1b} -AR phosphorylation in whole cells, the *in vivo* effect of these protein kinase inhibitors on agonist-stimulated $[^{35}S]GTP\gamma S$ binding to membranes was tested. These protein kinase inhibitors by themselves did not block the *in vitro* effects of norepinephrine ($p < 0.001$ versus its basal) and ET-1 ($p < 0.001$ versus its basal) on this parameter in control membranes (Fig. 9, bottom). In membranes from cells incubated with the protein kinase inhibitors and norepinephrine, the catecholamine ($p < 0.05$ versus its basal) and ET-1 ($p < 0.001$ versus its basal) increased $[^{35}S]GTP\gamma S$ binding (Fig. 9, bottom). However, the effects were clearly smaller than those observed in membranes from cells incubated without norepinephrine. In membranes from cells incubated with the protein kinase inhibitors and ET-1, norepinephrine ($p < 0.001$ versus its basal), but not ET-1, increased $[^{35}S]GTP\gamma S$ binding *in vitro* (Fig. 9, bottom). Finally, we studied comparatively the effect of norepinephrine and ET-1 on surface α_{1b} -AR. It can be observed that norepinephrine induced a small decrease in surface receptors but, in contrast, ET-1 did not produce any decrease (Fig. 10).

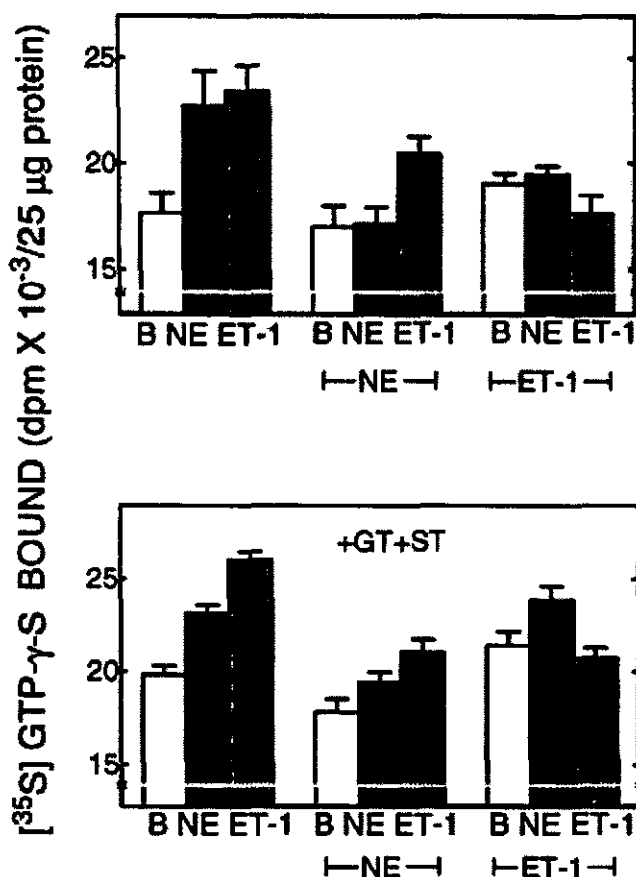


FIG. 9. *In vitro* agonist-stimulated [^{35}S]GTP γ S binding to membranes from cells preincubated with agonists and protein kinase inhibitors. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were incubated without (top) or with 10 μM genistein and 300 nM staurosporine (+GT+ST, bottom) for 30 min. The cells were incubated for 5 min in the absence of agonist (first group in each panel) or presence of 10 μM norepinephrine (NE, second group in each panel) or 10 nM ET-1 (ET-1, third group in each panel), and membranes were prepared. *In vitro* [^{35}S]GTP γ S binding to membranes was performed in the absence of any agent (B), 10 μM norepinephrine (NE) or 10 nM ET-1 (ET-1). Plotted are the means \pm the S.E. of 15-20 determinations using membranes obtained from 3 different cultures.

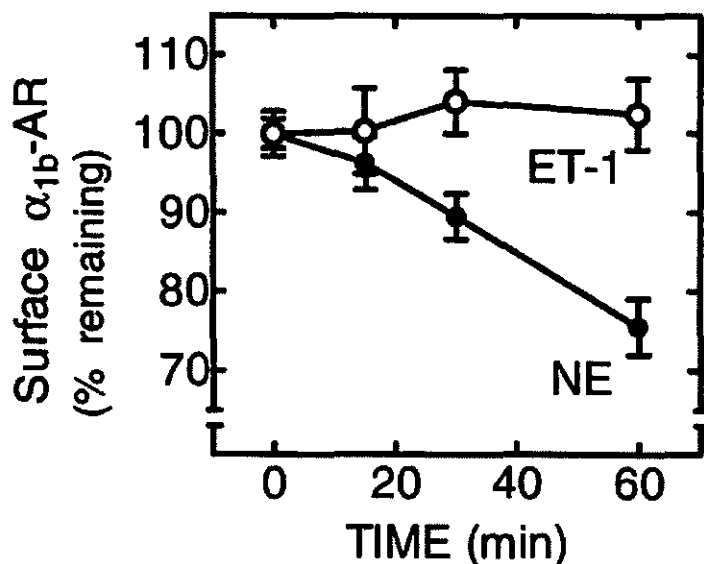


FIG. 10. Effect of norepinephrine and ET-1 on surface α_{1b} -AR. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were incubated without agent or with 10 μ M norepinephrine (solid circles) or 10 nM ET-1 (open circles) for the times indicated, and [3 H]prazosin binding was performed as described under "Experimental Procedures." Data were normalized to the surface receptor density observed in cells incubated without agonist (100%). Plotted are the means \pm S.E. of 3 experiments performed in triplicate with 3 different cell cultures.

DISCUSSION

In the present work, the phosphorylation of α_{1b} -AR, expressed by stable transfection in rat-1 fibroblasts, was studied. Our results clearly show that activation of ET_A receptors, endogenously expressed in these cells, leads to phosphorylation of α_{1b} -ARs. The effect of ET-1 was of greater magnitude than that of norepinephrine (homologous), suggesting that a strong process of rapid heterologous regulation takes place in these cells. This effect of ET-1 seems to involve the participation of serine/threonine and tyrosine kinases, since it is partially blocked by staurosporine and genistein, and it is almost completely inhibited when these inhibitors acted together. The temporal course for the α_{1b} -AR phosphorylation induced by ET-1 stimulation is similar to the time course detected for the translocation of PKC- δ and PKC- ϵ isoforms in neonatal ventricular myocytes stimulated with ET-1 (37). The isoforms of PKC detected in rat-1 fibroblasts (38) and in neonatal ventricular myocytes (37) are the same (*i.e.* α , δ , ϵ , and ζ isoforms), which suggests the possibility that δ and ϵ PKC-isoforms could be involved in the phosphorylation of α_{1b} -ARs induced by activation of ET_A receptors in rat-1 cells. Moreover, the experiments in neonatal ventricular myocytes showed that the translocation of δ and ϵ PKC isoforms is stronger in the cells activated with ET-1 than in those in which phenylephrine was used (37). Coincidentally, in the present study the action of ET-1 was also stronger than that of norepinephrine. These data further suggest that the effect of ET-1 on the phosphorylation state of α_{1b} -ARs could be mediated, at least in part, by the activation of PKC. Consistent with our present findings, it has been reported that TPA elicits a stronger phosphorylation of α_{1b} -ARs than an homologous stimulus (9).

Several studies have demonstrated the cross-regulation between receptors coupled to different signal transduction pathways. For example, activation of adenylyl cyclase counterregulates phosphoinositide turnover through phosphorylation of phospholipase C by protein kinase A (39), actions of β -adrenergic receptors can be inhibited by insulin, and this effect seems to involve β -adrenergic receptor tyrosine phosphorylation (40, 41). Similarly, as already mentioned, G-protein-coupled receptors (ET_A receptors) can influence the activity of tyrosine kinase receptors (EGF receptors) (26). Cross-regulation between receptors coupled to the same transduction pathway (particularly receptors coupled to phosphoinositide turnover and intracellular calcium mobilization) has been difficult to substantiate due to the labile characteristics of the mediators involved and their pools and to the recovery period required to elicit maximum calcium responses. The direct effect on the receptors has been studied to a lesser extent, but some examples have already suggested cross-regulation at this level. For example, it has been shown that ET-1 induces internalization of thrombin receptors via a PKC-mediated process (42). In addition, cross-regulation between several members of lymphocyte chemotactic receptors involving phosphorylation and the possible participation of PKC has recently been shown (43).

Endothelin seems to be able to cross-regulate the activity of coexpressed receptors in different cell systems, and in some cases PKC activation seems to participate. In neuroblastoma-glioma hybrid cells, ET-1 induces partial heterologous desensitization of the calcium response elicited by ATP and has no influence on the response elicited by bradykinin (44). In rat urinary bladder, the endothelial peptide potentiates the contractions evoked by exogenous ATP in a selective way since it did not modify the contractions induced by acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, prostaglandin F_{2 α} or bradykinin (45). In cardiac myocytes, ET-1 enhances the calcium transients triggered by ATP, and this effect was sensitive to inhibitors of protein kinase C; it also inhibits a K⁺ current by means of a PKC-dependent mechanism (46).

The participation of serine/threonine and tyrosine kinases in the ET-1-induced phosphorylation of α_{1b} -AR is supported by the partial inhibition achieved by staurosporine and genistein. The partial blockade obtained by each inhibitor suggest that such kinases acted by independent pathways in the phosphorylation of the receptor, and neither seemed to be mediated by PTX-sensitive G proteins. Phosphoaminoacid analysis revealed mainly the presence of Ser(P) and trace amounts of Thr(P) in basal and stimulated conditions, coincident with previous reports for the norepinephrine- and phorbol ester-stimulated phosphorylation of α_{1b} -AR in DDT1 MF-2 cells (11) and *in vitro* PKC-mediated phosphorylation of the receptor (12). The absence of Tyr(P) in the phosphoaminoacid analysis suggests that a putative genistein-sensitive kinase could act in a step previous to the phosphorylation of the receptor. However, we cannot discard the possibility that the detection of this phosphoaminoacid could have remained under the limits of detection of our assay. Norepinephrine-induced α_{1b} -AR phosphorylation was not inhibited by staurosporine or genistein, and only a partial blockade was observed when both inhibitors were used together. Current ideas suggest that GRKs play a major role in homologous desensitization of α_{1b} -ARs (10). At this point, it is not clear why the combination of staurosporine and genistein partially inhibits norepinephrine-induced α_{1b} -AR phosphorylation. Further experiments will be required to address this point. However, the effect of the inhibitors is also observed on the ability of norepinephrine to stimulate [³⁵S]GTP γ S binding in membranes from cells pretreated with the catecholamine. Thus, there seems to be a relationship between these two parameters.

Our functional data indicate that activation of ET_A receptors alters the ability of norepinephrine to increase [Ca²⁺]_i. These experiments are complicated since the response to a new addition of ET-1 was also decreased, and the strong effect of ET-1 on this parameter may even lead to depletion of the intracellular calcium stores. However, even in these experiments, it is clear that low concentrations of endothelin-1 that induced small increases in [Ca²⁺]_i (compare, e.g., 0.1 nM ET-1 with 10 nM ET-1) markedly inhibited the effect of norepinephrine. Such action cannot be attributed to calcium depletion. Moreover, the [³⁵S]GTPγS binding data strongly suggest that activation of ET_A receptors alters the functional interaction of α_{1b} -AR with G proteins. Such alteration was avoided when staurosporine and genistein were present during the incubation of the cells with ET-1. Again, there seems to be a relationship between receptor phosphorylation and catecholamine-stimulated [³⁵S]GTPγS binding.

In rat-1 fibroblasts, participation of cytosolic tyrosine kinases in the signaling pathways activated by endothelin is supported by the observation that in *v-src*-transformed cells, the accumulation of IP₃ and calcium induced by endothelin was dramatically amplified; in contrast, thrombin-dependent responses were only slightly reduced (31). Focal adhesion kinase is subjected to tyrosine phosphorylation in rat-1 fibroblasts stimulated with endothelin, and this effect was attenuated when the activity of PKC was down-regulated or inhibited. Besides, pp42 and pp44 forms of mitogen-activated protein kinase are also phosphorylated in residues of tyrosine, and this effect is reduced by pretreatment with PTX, whereas the mentioned tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase remained intact (24). On the other hand, rat-6 fibroblasts, overexpressing PKC- β 1, showed an increased calcium signaling in the presence of endothelin; in this case, an increase in the number of ET_A receptors was detected (47). It is possible that GRKs could be activated by ET_A receptors; however, GRKs are reported to phosphorylate only receptors in the agonist-occupied state; the participation of these kinases in the heterologous phosphorylation of α_{1b} -ARs seems unlikely. However, we have no evidence on the activation of GRKs after ET-1 stimulation, and we cannot discard the possibility of their participation. Recently, a role for Rho in mediating endothelin and phorbol esters stimulation of phospholipase D has been determined in rat-1 fibroblasts (25). Besides, phospholipase D seems to be regulated by PKC and protein kinase D in these cells (48), and GRK2 is also modulated by PKC, opening the possibility of regulation of α_{1b} -AR by different kinases activated in cascade after the stimulation of ET-1 receptors.

Our studies on surface receptors also gave some interesting results. In rat-1 fibroblasts, norepinephrine induced a relatively modest and slow decrease in surface receptors. This is consistent with data obtained by another group using the same cell type (9) but differs from observations for these receptors in other cells (49, 50). Cell differences may exist in the rates and regulation of receptor internalization and recycling. Nevertheless, in our experiments a dissociation between receptor phosphorylation and internalization is evidenced; *i.e.* activation of ET_A receptors markedly stimulated α_{1b} -AR phosphorylation but did not induce clear loss of surface receptor binding. The possibility that phosphorylation of specific serine/threonine residues of the α_{1b} -AR could be important in receptor internalization cannot be ruled out. In fact, it has been observed that TPA induces α_{1b} -adrenoreceptor internalization (49, 50) and that catecholamine-stimulated internalization is inhibited by staurosporine (49).

In summary, our data indicate that 1) activation of endothelin ET_A receptors induces the phosphorylation of α_{1B} -ARs, 2) receptor phosphorylation takes place mainly in serine residues, 3) PKC and tyrosine kinases seem to participate in such effect, and 4) ET-1-induced α_{1B} -AR phosphorylation alters receptor-G protein coupling. ET_A and α_{1B} -ARs coexist in many cells, where it could be anticipated that the activation of ET-1 receptors may regulate the actions of α_{1B} -ARs.

Acknowledgments—We are grateful to Drs. Alejandro Zentella and Luis Vaca for use of equipment; to Dr. Héctor Malagón for help; and to Drs. L. Allen, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz for the generous donation of transfected rat-1 fibroblasts.

REFERENCES

1. Lefkowitz, R. J., and Caron, M. G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4993-4996
2. Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J., and Piasck, M. T. (1996) *Circ. Res.* **78**, 737-749
3. Minneman, K. P., and Esbenshade, T. A. (1994) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 117-133
4. Hieble, J. P., Bylund, D. B., Clarke, D. E., Eikenburg, D. C., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., and Ruffolo, R. R., Jr. (1995) *Pharmacol. Rev.* **47**, 267-270
5. Benovic, J. L., DeBlasi, A., Stone, W. C., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) *Science* **246**, 235-240
6. Premont, R. T., Inglese, J., and Lefkowitz, R. J. (1995) *FASEB J.* **9**, 175-183
7. Chuang, T. T., Iacovelli, L., Sallese, M., and De Blasi, A. (1996) *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 416-421
8. Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., Lomasney, J. W., DeBernardis, J. F., Lefkowitz, R. J., and Caron, M. G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 5651-5655
9. Lattion, A.-L., Diviani, D., and Cotecchia, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22887-22893
10. Diviani, D., Lattion, A.-L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J. L., and Cotecchia, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 5049-5058
11. Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3098-3105
12. Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L. M. F., Benovic, J. L., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3106-3113
13. Corvera, S., and García-Sáinz, J. A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**, 1128-1133
14. Corvera, S., Schwarz, K. R., Graham, R. M., and García-Sáinz, J. A. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 520-526
15. Lynch, C. J., Charest, R., Bocckino, S. B., Exton, J. H., and Blackmore, P. F. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2844-2851
16. Cooper, R. H., Coll, K. E., and Williamson, J. R. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3281-3288
17. Vázquez-Prado, J., and García-Sáinz, J. A. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 17-22
18. Van der Bend, R. L., De Widt, J., Van Corven, E. J., Moolenaar, W. H., and Van Blitterswijk, W. (1992) *Biochem. J.* **285**, 235-240
19. James, A. F., Xie, L.-H., Fujitani, Y., Hayashi, S., and Horie, M. (1994) *Nature* **370**, 297-300

20. Ono, K., Tsujimoto, G., Sakamoto, A., Eto, K., Masaki, T., Ozaki, Y., and Satake, M. (1994) *Nature* **370**, 301-304
21. Haber, E., and Lee, M.-E. (1994) *Nature* **370**, 252-253
22. Simonson, M. S., Wang, Y., and Herman, W. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 77-82
23. Zachary, I., Sinnott-Smith, J., Turner, C. E., and Rozengurt, E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22060-22065
24. Saville, M. K., Graham, A., Malarkey, K., Paterson, A., Gould, G. W., and Plevin, R. (1994) *Biochem. J.* **301**, 407-414
25. Malcolm, K. C., Willott, C. M., and Exton, J. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13135-13139
26. Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996) *Nature* **379**, 557-560
27. Sekura, R. D., Fish, F., Manclark, C. R., Meade, B., and Zhang, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14647-14651
28. Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., and Kobilka, B. K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7159-7163
29. García-Sáinz, J. A., Huerta-Bahena, M. E., and Malbon, C. C. (1989) *Am. J. Physiol.* **256**, C384-C389
30. Boyle, W. J., Van der Geer, P., and Hunter, T. (1991) *Methods Enzymol.* **201**, 110-149
31. Mattingly, R. R., Wasilenko, W. J., Woodring, P. J., and Garrison, J. C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 7470-7477
32. Wieland, T., and Jakobs, K. H. (1994) *Methods Enzymol.* **237**, 3-13
33. Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450
34. Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J.-P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., and Bouvier, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 16384-16392
35. Nambi, P., Pullen, M., Wu, H. L., Lee, D., Saunders, D., Heys, R., Aiyar, N., Leber, J., Elliott, J., Brooks, D., Holstein, E., and Ruffolo, R. R., Jr. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 1567-1571
36. Ambar, I., and Sokolovsky, M. (1993) *Eur. J. Pharmacol.* **245**, 31-41
37. Clerk, A., Bogoyevitch, M. A., Andersson, M. B., and Sugden, P. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 32848-32857
38. Berti, L., Mosthaf, L., Kroder, G., Kellerer, M., Tippmer, S., Mushack, J., Seffer, E., Seedorf, K., and Häring, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3381-3386
39. Liu, M., and Simon, M. I. (1996) *Nature* **382**, 83-87
40. Hadcock, J. R., Port, J. D., Gelman, M. S., and Malbon, C. C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 26017-26022
41. Karoor, V., Baltensperger, K., Paul, H., Czeck, M. P., and Malbon, C. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25305-25308
42. Chen, X., Berrou, J., Nguyen, G., Sraer, J.-D., and Rondeau, E. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 445-451
43. Richardson, R. M., Haribabu, B., Ali, H., and Snyderman, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 28717-28724
44. Chau, L.-Y., Lin, T. A., Chang, W.-T., Chen, C.-H., Shue, M.-J., Hsu, Y.-S., Hu, C.-Y., Tsai, W.-H., and Sun, G. Y. (1993) *J. Neurochem.* **60**, 454-460
45. Donoso, M. V., Salas, C., Sepúlveda, G., Lewin, J., Fournier, A., and Huidobro-Toro, J. P. (1994) *Br. J. Pharmacol.* **111**, 473-482
46. Damron, D. S., Van Wagoner, D. R., Moravec, C. S., and Bond, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 27335-27344

47. Pacher, J. A., Mayer-Ezell, R., Cleven, R. M., and Fawzi, A. B. (1993) *Biochem. J.* **294**, 153-158
48. Zuzaga, J. L., Sinnott-Smith, J., Van Lint, J., and Rozengurt, E. (1996) *EMBO J.* **15**, 6220-6230
49. Fonseca, M. I., Button, D. C., and Brown, R. D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8902-8909
50. Beeler, J. F., and Cooper, R. H. (1995) *Biochem. J.* **305**, 73-79

“Cross Talk”: Fosforilación de los Receptores α_{1B} -Adrenérgicos Inducida por la Activación de Receptores B₂ de Bradicinina (*)

(*) Trabajo Publicado en: *FEBS Letters* (1998), 422: 141-145

Crosstalk: phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B₂ receptors

Luz del Carmen Medina^{a,b}, José Vázquez-Prado^a, María Elena Torres-Padilla^a, Artemio Mendoza-Mendoza^a, Mario Ernesto Cruz-Muñoz^a, J. Adolfo García-Sáinz

^aDepartment of Cell Biology, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-248, México D.F. 04510, México

^bDepartment of Biology of Reproduction, División de CBS, UAM-Iztapalapa, Av. Michoacán y Purísima, México D.F. 09340, México

Abstract. The action of bradykinin was studied in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1b} -adrenoceptors. It was observed that bradykinin and kallidin markedly increase cytosol calcium concentration, but that the B₁ agonist, des-Arg⁹-bradykinin, only mimicked this effect to a minimal extent. Antagonists, selective for the B₂ subtype, such as Hoe 140, blocked this effect of bradykinin and kallidin. Similarly, bradykinin and kallidin stimulated the production of inositol phosphates and B₂ antagonists blocked their actions. The possibility that bradykinin could modulate α_{1b} -adrenoceptors was studied. It was observed that bradykinin and kallidin increased α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation and that such effect was also blocked by Hoe 140. Interestingly, the ability of norepinephrine to increase intracellular calcium concentration was not altered by pretreatment of the cells with bradykinin, *i.e.* bradykinin induced α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation but this did not lead to receptor desensitization.

1. Introduction

Protein phosphorylation is a well-known cardinal event in the regulation of cellular functioning. The properties (*i.e.* activity, intracellular location, etc.) of many proteins, such as those involved in the control of metabolism or in signal transduction are critically influenced by phosphorylation. Among those proteins involved in signal transduction, G protein-coupled receptors are important targets of protein kinases [1, 2].

α_{1b} -adrenoceptors are members of the seven transmembrane domains G protein-coupled families of receptors that modulate phosphoinositide turnover and calcium signalling [3-5]. The function of these receptors seems to be regulated by phosphorylation/dephosphorylation reactions. Agonist stimulation induces homologous desensitization of these receptors, which is associated to receptor phosphorylation [6-11]; there is evidence that kinases specific for the agonist-occupied G protein-coupled receptors, such as GRK2 and GRK3 participate in this desensitization [10]. In addition, activation of non-adrenergic receptors can also lead to α_{1b} -adrenoceptor (heterologous) desensitization [7,11-13]. We have previously shown that endothelin through ET_A receptors induces the phosphorylation and desensitization of α_{1b} -adrenoceptors in rat-1 fibroblasts; protein kinase C and putative protein tyrosine kinase(s) seem to participate in this type of desensitization. However, the information that exists about this process is very limited.

Bradykinin is a nonapeptide local mediator, prototypic member of the kinins. This peptide mediates important physiological functions such as smooth muscle contraction, cell growth or ion transport in a large variety of cells [14,15]. It also participates in pathophysiological processes such as pain sensation, hypotension and edema formation [14]. The actions of bradykinin are mediated through two types of receptors, B₁ and B₂; most of its physiological

actions involve the B₂ subtype [14, 15]. In the present paper we show that activation of bradykinin B₂ receptors induces phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors.

2. Materials and Methods

Bradykinin, kallidin (Lys-bradykinin), des-Arg⁹-bradykinin, N α -adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³,Thi^{5,8}, D-Phe]-bradykinin, des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin, (-)-norepinephrine, endothelin, protease inhibitors and all other reagents, unless stated otherwise, were obtained from Sigma Chemical Co. Hoe 140 and des-Arg¹⁰-Hoe 140 were from Research Biochemicals International. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, trypsin, antibiotics and other reagents used for cell culture were from Gibco BRL. Myo-[2-³H]inositol (22.9 Ci/mmol) and [³²P]P_i (8500-9120 Ci/mmol) were from New England Nuclear. Sepharose-coupled protein A was from Upstate Biotechnology and Fura-2/AM was from Molecular Probes.

Rat-1 fibroblasts transfected with the hamster α_{1b} -adrenoceptor [16], were generously provided to us by Drs. R.J. Lefkowitz, M.G. Caron and L. Allen (Duke University). The cells 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% CO₂ atmosphere, as described previously [11, 17]. In the present experiments, cells at confluence were serum-deprived in unsupplemented DMEM for 24 h.

Receptor phosphorylation studies were performed as described in detail [11]. In brief, cells were maintained in phosphate-free DMEM during 1 h and then incubated in 3 ml of the same medium containing [³²P]P_i (0.05 mCi/ml) for 3 h at 37 °C. Labeled cells were stimulated as indicated, then they were washed twice with ice-cold phosphate buffered saline and solubilized with 1 ml of ice-cold solubilization buffer [11]. The extracts were centrifuged and the supernatants transferred to tubes containing anti- α_{1b} -adrenoceptor antiserum and Sepharose-coupled protein A and immunoprecipitated as described [11]. The amount of phosphorylated receptor was determined by PhosphorImager analysis. At least three independent experiments were performed for each treatment. Data were analyzed and plotted using commercial software (Prism 2.01, GraphPad Software).

Intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was quantified as described [17]. In brief, fibroblasts were incubated overnight in DMEM without serum and antibiotics. Cells were loaded with Fura-2/AM in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4 for 1 h at 37°C. Fluorescence measurements were performed with excitation monochromators set at 340 and 380 nm, with a chopper interval of 0.5 s, and the emission monochromator set at 510 nm. The $[Ca^{2+}]_i$ was calculated according to Grynkiewicz, *et al.* [18] using the software provided by AMINCO-Bowman; traces were directly exported to the graphs. K_i values were calculated according to Cheng and Prusoff [19].

Production of [³H]inositol phosphates was performed essentially as described [17]. Briefly, cells were labeled with [³H]inositol (6 μ Ci/ml) for 18-24 h in 1 ml of inositol-free DMEM

containing 1% fetal bovine serum. Cells were washed twice with Krebs-Ringer-HEPES buffer containing 1.3 mM CaCl₂ and preincubated for 20 min in buffer containing 10 mM LiCl. Incubations with the agents to be tested were for 15 min and were terminated by the addition of perchloric acid. [³H]inositol phosphates were separated by Dowex AGI-X8 chromatography [20]. Total [³H]inositol phosphate production is presented.

3. Results and Discussion

Previous studies have shown that there is clonal variation in the presence of endogenous bradykinin receptors in rat-1 fibroblasts. In some clones, a small number of receptors have been found [21] whereas in others no binding sites or functional responses have been detected [22]. In addition, it has been reported that the expression of some genes, such as the *ras* oncogene, markedly increases the expression of bradykinin receptors in these cells [21]. Therefore, we investigated the presence of endogenous bradykinin receptors in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1b} -adrenoceptors, by studying two functional responses, i.e. the ability of bradykinin to increase [Ca²⁺]_i and to induce the production of [³H]inositol phosphates.

It can be observed in Fig. 1 that bradykinin and kallidin increased in concentration-dependent fashion [Ca²⁺]_i in these cells; both natural agonists had similar potency (EC₅₀ ~ 50 nM) and equal efficacy. In contrast, the B₁-selective agonist, des-Arg⁹-bradykinin only induced a marginal increase in [Ca²⁺]_i (Fig. 1, upper panel). The effect of 100 nM bradykinin on this parameter was inhibited in concentration-dependent fashion by the B₂ antagonists, Hoe 140 and N α -adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³,Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-bradykinin; the former was consistently more potent than the latter (K_i values 3.5 nM and 18 nM, respectively) (Fig. 1, middle panel). Des-Arg¹⁰-Hoe 140, a B₁-selective antagonist, only partially inhibited the effect of bradykinin at the highest concentration tested whereas des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin, another B₁-selective antagonist, was completely ineffective in the range of concentrations tested (Fig. 1, middle panel). The effect of kallidin on [Ca²⁺]_i was also completely blocked by Hoe 140 (Fig. 1, lower panel). The antagonists by themselves did not modify basal [Ca²⁺]_i. The data clearly indicated that bradykinin receptors of the B₂ subtype were present in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1b} -adrenoceptors.

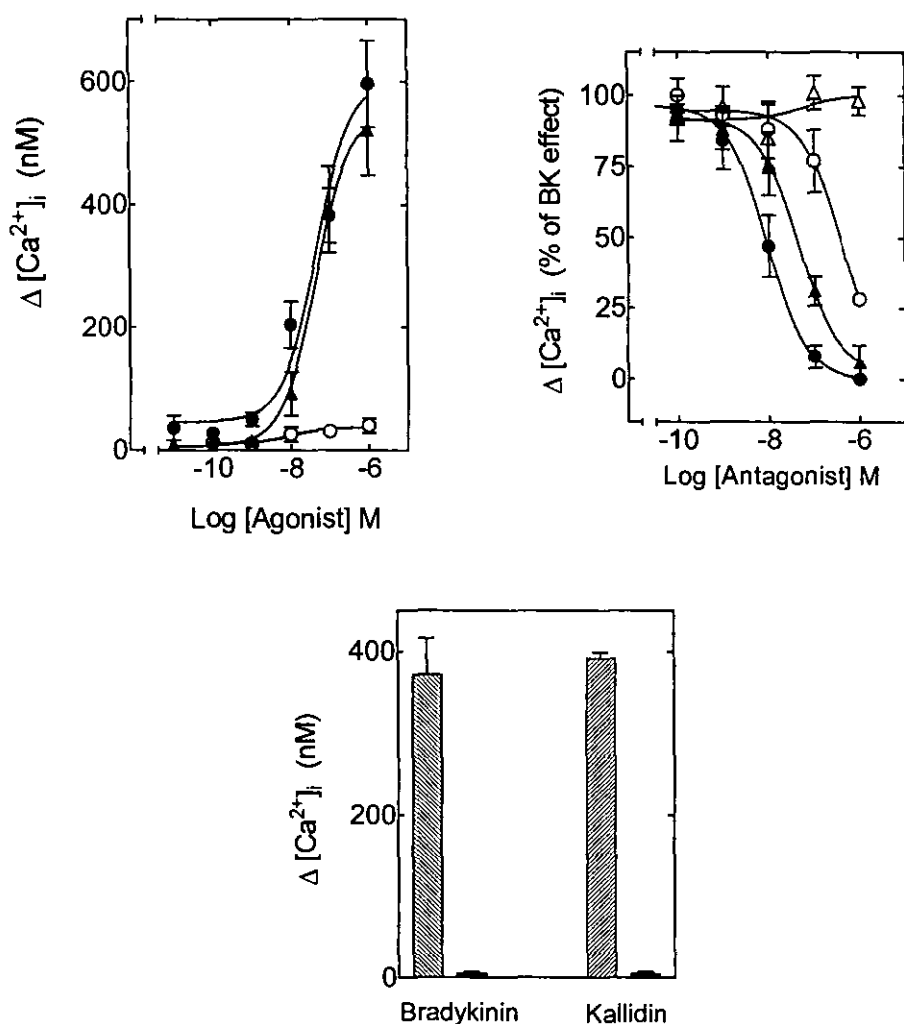


FIG. 1. Effect of bradykinin agonists and antagonists on intracellular free calcium concentration. Upper panel: cells were incubated in the presence of different concentrations of bradykinin (closed circles), kallidin (closed triangles) or des-Arg⁹-bradykinin (open circles). Data are the changes in intracellular calcium in response to the agents; basal [Ca²⁺]_i was 128 ± 19 nM. Plotted are the means ± S.E.M. of 3-7 experiments using different cell cultures. Middle panel: cells were incubated for 1 min in the presence of different concentrations of the antagonists: Hoe 140 (solid circles), N α -adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,8}, D-Phe]-bradykinin (solid triangles), des-Arg¹⁰-Hoe 140 (open circles) or des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin (open triangles); after this preincubation 100 nM bradykinin (BK) was added. Data are the changes in intracellular calcium in response to bradykinin as compared to the effect of that of bradykinin alone (100%). Plotted are the means ± S.E.M. of 3-4 experiments using different cell cultures. Lower panel: cells were preincubated for 1 min in the absence of antagonist (dashed columns) or presence of 1 μ M Hoe 140 and challenged with 100 nM bradykinin (left group) or 100 nM kallidin (right group). Data are the changes in intracellular calcium in response to the agents; basal [Ca²⁺]_i was 101 ± 15 nM. Plotted are the means ± S.E.M. of 3 experiments using different cells cultures.

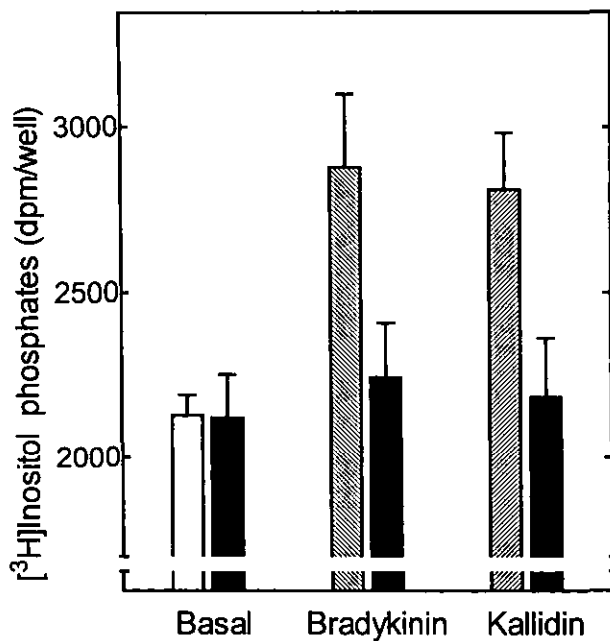


FIG. 2. Effect of bradykinin agonists and antagonists on [³H]inositol phosphate production. Cells were incubated in the absence or presence (solid columns) of 1 μM Hoe 140 with no other agent (left group), 100 nM bradykinin (middle group) or 100 nM kallidin (right group). Plotted are the means ± S.E.M. of 5-7 experiments using different cell cultures.

The ability of bradykinin to increase $[Ca^{2+}]_i$ was observed in buffer containing 2.5 mM EGTA (data not shown) which indicated that calcium mobilization from intracellular stores was involved. Therefore, the ability of these agents to stimulate the production of [³H]inositol phosphates was tested. Bradykinin and kallidin stimulated the production of [³H]inositol phosphates and their effects were completely blocked by Hoe 140 (Fig. 2). The data confirmed that these cells endogenously express B₂ bradykinin receptors and further indicated that these receptors are coupled to phosphoinositide turnover and calcium mobilization, as observed in many other models [14, 15, 22]. It should be mentioned that the effect of bradykinin on this parameter is relatively small (40-50% over basal), since in the same experiments 10 nM endothelin was able to increase [³H]inositol phosphate production up to 2.5-fold (data not shown).

We next examined the possibility that activation of B₂ bradykinin receptors may lead to α_{1b}-adrenoceptor phosphorylation. As shown in Fig. 3, bradykinin induced phosphorylation of the adrenergic receptor in a concentration-dependent fashion. The maximum increase was ~ 40-50% over basal and it was observed at concentrations between 1 and 3 μM, with an EC₅₀ of ~ 500 nM. Kallidin was also able to induce α_{1b}-adrenoceptor phosphorylation and the effect of both natural agonists, bradykinin and kallidin, was completely blocked by the B₂ antagonist, Hoe 140 (Fig. 4). The antagonist by itself was without effect on the basal receptor labeling. These data clearly indicate that the same B₂ receptors mediate both actions of bradykinin, increase in $[Ca^{2+}]_i$ and induction of adrenoceptor phosphorylation. The 10-fold difference in EC₅₀ values observed for these effects of the peptide is not surprising. This difference suggests that bigger receptor occupation than calcium mobilization is required to induce receptor phosphorylation, or expressed in other words, that a small generation of IP₃ could be sufficient to increase $[Ca^{2+}]_i$ but that other factors are important to induce receptor phosphorylation.

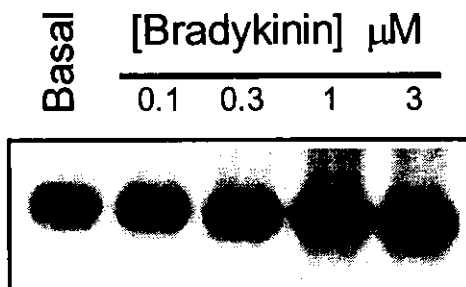
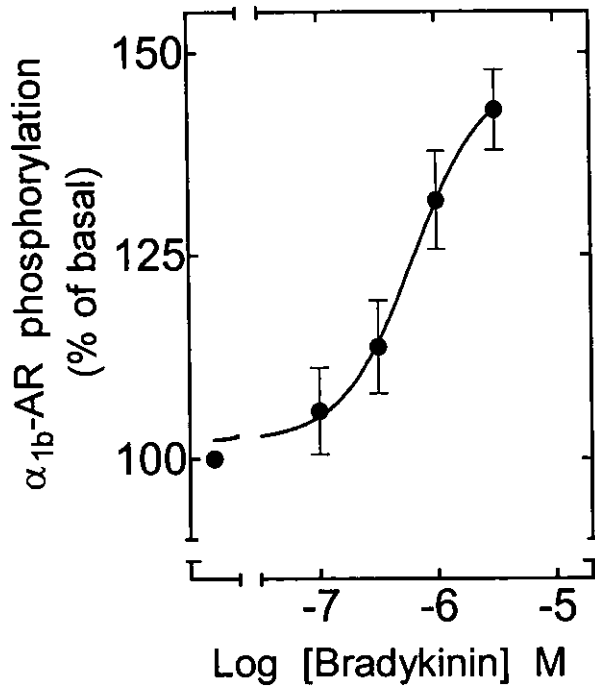


FIG. 3. Effect of bradykinin on α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation. Cells were incubated in the absence (basal) or presence of different concentrations of bradykinin. Plotted are the means \pm S.E.M. of 4-5 experiments using different cell cultures. In the lower panel a representative autoradiograph is presented.

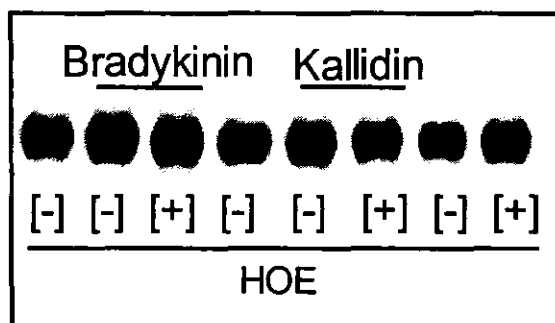
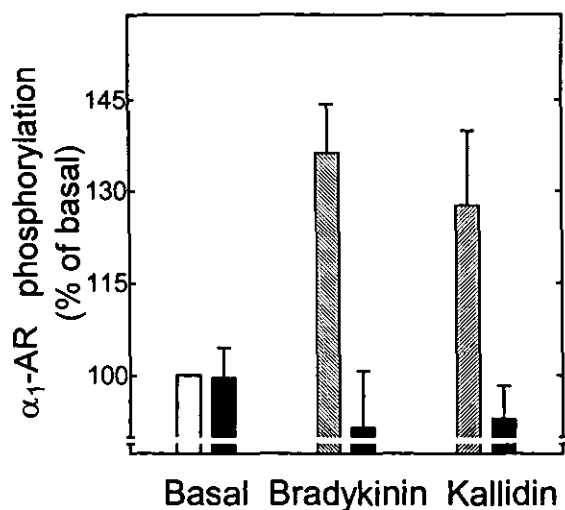


FIG. 4. Effect of bradykinin agonists and antagonists on α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation. Cells were incubated in the absence or presence (solid columns) of 1 μ M Hoe 140 with no other agent (left group, basal), 1 μ M bradykinin (middle group) or 1 μ M kallidin (right group). Plotted are the means \pm S.E.M. of 4-5 experiments using different cell cultures. In the lower panel a representative autoradiograph is presented.

We next studied the functional consequences of bradykinin induced adrenoceptor phosphorylation by examining the effect of norepinephrine on $[Ca^{2+}]_i$. As shown in Fig. 5, 10 μ M norepinephrine induced a marked increase in $[Ca^{2+}]_i$. When cells were pretreated with 1 μ M bradykinin the effect of norepinephrine was not affected. Under the same conditions, 10 nM endothelin markedly decreased the effect of norepinephrine on this parameter (Fig. 5). It should be mentioned that even lower concentrations of endothelin that induce a much smaller effect on $[Ca^{2+}]_i$ were able to diminish clearly the effect of norepinephrine (data not shown, please see [11]). In addition, we studied if the actions of smaller concentrations of norepinephrine were affected by the action of the peptide without observing any clear effect (data not shown). The possibility that a longer exposure to bradykinin (up to 15 min) could be required to affect the action of the catecholamine was tested without success (data not shown). It was clear, therefore, that in spite of inducing receptor phosphorylation, bradykinin did not lead to α_{1b} -adrenoceptor desensitization in rat-1 fibroblasts.

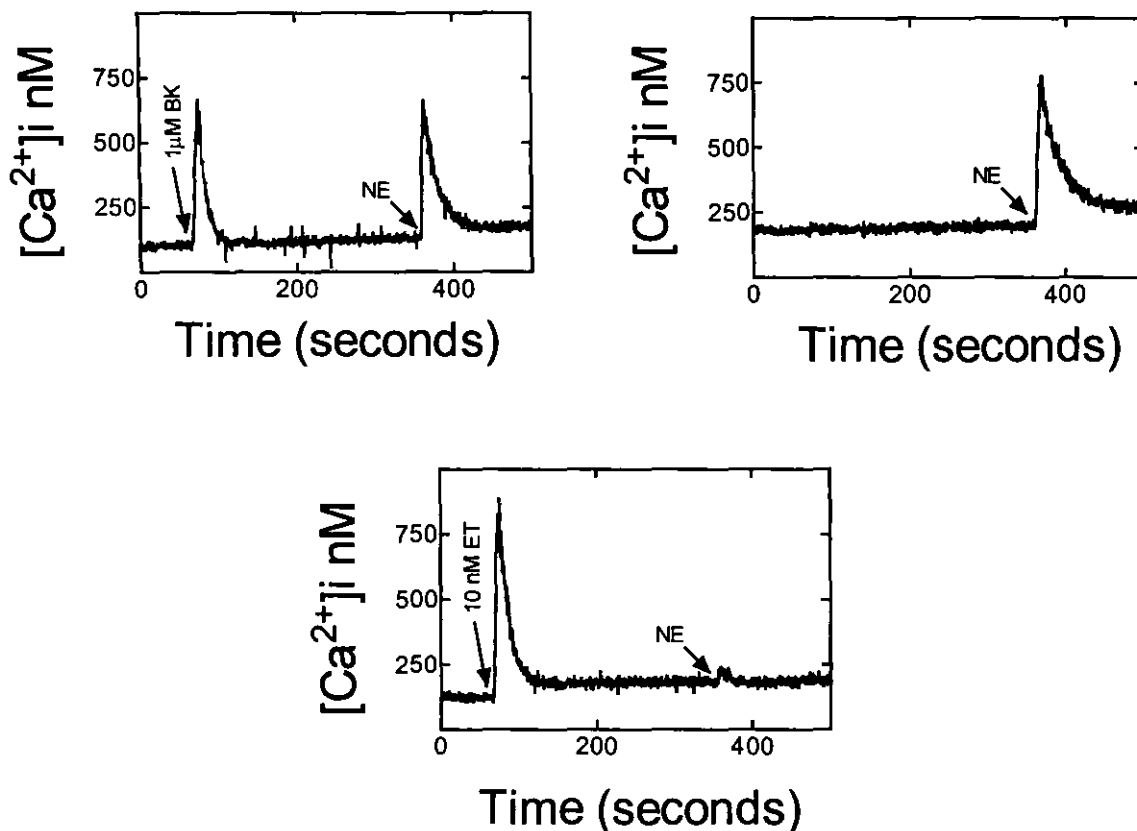


FIG. 5. Effect of bradykinin and endothelin on the increase in intracellular calcium induced by norepinephrine. Cells were challenged with 10 μ M norepinephrine (NE), 1 μ M bradykinin (BK) or 10 nM endothelin (ET). Data were directly imported from the fluorometer computer and are representative of 3 experiments using different cell cultures.

Our results are consistent with data previously published in DDT₁ MF-2 cells in which it was observed that bradykinin induced a small effect on phospholipid labeling and also phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors [7]. However, some marginal desensitization of the α_{1b} -adrenergic action was detected in those experiments [7]. It is possible, therefore, that the strength of the signal generated by bradykinin could be insufficient to desensitize α_{1b} -adrenergic action in rat-1 fibroblasts but that in other cells where α_{1b} -adrenoceptors and B₂ bradykinin receptors are coexpressed, such interaction may have functional consequences. Nevertheless, it is clear that receptor phosphorylation does not necessarily indicate receptor desensitization. In fact, it has been observed that overexpression of GRK5 and GRK6 markedly increases α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation but does not affect the receptor-mediated responses [10]. Additionally, our data clearly indicate that agonist-induced calcium mobilization is not sufficient to induce desensitization of α_{1b} -adrenoceptors. Activation of protein kinase C and putative protein tyrosine kinase(s) seem to mediate α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation induced by heterologous stimuli [11]. Interestingly, bradykinin is able to activate protein kinase C [23] and there is also evidence that the kinin induces protein tyrosine phosphorylation [24].

In summary, our data indicate that bradykinin B₂ receptors are endogenously expressed in rat-1 fibroblasts and that activation of such receptors induces increases in $[Ca^{2+}]_i$, phosphoinositide turnover and leads to α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to Dr. Luis Vaca for his generous gift of samples of some bradykinin agonists and antagonists. This research was partially supported by a Grant from DGAPA (IN 200596).

References

1. Ferguson, S., Zhang, J., Barak, L.S. and Caron, M.G. (1997) *News Physiol. Sci.* 12, 145-151.
2. Premont, R.T., Inglese, J. and Lefkowitz, R.J. (1995) *FASEB J.* 9, 175-183.
3. Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4993-4996.
4. Graham, R.M., Perez, D.M., Hwa, J. and Piasek, M.T. (1996) *Circ. Res.* 78, 737-749.
5. Minneman, K.P. and Esbenshade, T.A. (1994) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 117-133.
6. Leeb-Lundberg, L.M.F., Cotecchia, S., Lomasney, J.W., DeBernardis, J.F., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5651-5655.
7. Leeb-Lundberg, L.M.F., Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 3098-3105.
8. Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L.M.F., Benovic, J.L., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 3106-3113.
9. Lattion, A.-L., Diviani, D. and Cotecchia, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 22887-22893.
10. Diviani, D., Lattion, A.L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J.L. and Cotecchia, S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 5049-5058.
11. Vázquez-Prado, J., Medina, L.C. and García-Sáinz, J.A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27330-27337.
12. García-Sáinz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T. and Tussie-Luna, M.I. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 887, 73-79.
13. García-Sáinz, J.A. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 417-421.
14. Burch, R.M. and Kyle, D.J. (1992) *Life Sci.* 50, 829-838.
15. Hall, J.M. (1997) *Gen. Pharmacol.* 28, 1-6.
16. Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randall, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. and Kobilka, B.K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7159-7163.
17. Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J.A. (1996) *Mol. Pharmacol.* 50, 17-22.
18. Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
19. Cheng, Y.-C. and Prusoff, W.H. (1973) *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
20. Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1983) *Biochem. J.* 212, 473-482.
21. Roberts, R. and Gullick, W.J. (1989) *J. Cell Sci.* 94, 527-535.
22. Prado, G.N., Taylor, L. and Polgar, P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 14638-14642.
23. Tippmer, S., Qwitterer, U., Kolm, V., Faussmer, A., Roscher, A., Mosthaf, L., Müller-Esterl, W. and Häring, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* 225, 297-304.
24. Leeb-Lundberg, L.M.F. and Song, X.-H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 7746-7749.

**“Cross Talk” entre Receptores con Actividad de Cinasa de Tirosina y los
Receptores α_{1B} -Adrenérgicos (*)**

(*) Trabajo Enviado A Publicación

Cross-talk between Receptors with Intrinsic Tyrosine Kinase Activity and α_{1b} -Adrenoceptors*

Luz del Carmen Medina^{a,b}, José Vázquez-Prado^a and J. Adolfo García-Sáinz^a

^aDepartment of Cell Biology, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-248, México D.F. 04510, México

^bDepartment of Biology of Reproduction, División de CBS, UAM-Iztapalapa, Av. Michoacán y Purísima, México D.F. 09340, México

ABSTRACT. The effect of EGF and PDGF on the phosphorylation and function of α_{1b} -adrenoceptors transfected into Rat-1 fibroblasts was studied. EGF and PDGF increased the phosphorylation of these adrenoceptors. The effect of EGF was blocked by AG1478 and that of PDGF was blocked by AG1296, inhibitors of the intrinsic tyrosine kinase activities of their receptors. Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, blocked the α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation induced by EGF but not that induced by PDGF. Staurosporine and Ro 31-8220, inhibitors of protein kinase C, blocked the adrenoceptor phosphorylation induced by EGF and the effect of PDGF was completely prevented by staurosporine. The ability of norepinephrine to increase [³⁵S]GTP γ S binding in membrane preparations was used as an index of the functional coupling of the α_{1b} -adrenoceptors and G proteins. Norepinephrine-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding was markedly decreased in the membranes from cells pretreated with EGF or PDGF. Our data indicate that: 1) activation of EGF and PDGF receptors induced phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors, 2) phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the EGF response, but does not seem to play a major role in the action of PDGF, 3) protein kinase C mediated this action of both growth factors, and 4) the phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors induced by EGF and PDGF leads to desensitization of receptor.

INTRODUCTION

α_{1b} -Adrenergic receptors (α_{1b} -ARs) are members of the superfamily of the seven transmembrane domains G-protein-coupled receptors. These receptors couple to G_{q/11} protein to stimulate phospholipase C activity, which induces hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the subsequent formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol, which mediate the intracellular Ca²⁺ release and activation of protein kinase C (PKC), respectively (1-3).

Similar to most receptors of this superfamily, the activity of α_{1b} -ARs is tightly regulated. Agonist stimulation results in rapid attenuation of receptor responsiveness (desensitization), and receptor phosphorylation seems to be an essential event in this process (4-7). Homologous desensitization, in which only the receptors occupied by agonist reduces its responsiveness, involves phosphorylation of the receptor by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) (4-7). Receptor phosphorylation by GRKs promotes the binding of arrestin proteins, which in turn uncouple the receptor from the G-protein and enhances their sequestration (6-7). Heterologous desensitization, in which the stimulation by an agonist attenuates the response to an unrelated agent, mainly involves phosphorylation of receptor and other signaling entities by second messenger-activated kinases, such as protein kinase A (PKA) and PKC (4-7). Agonist-induced phosphorylation of the α_{1b} -AR seems to be mediated by GRK2 and GRK3 isoenzymes (8), whereas the phosphorylation of receptor by PKC mainly participates in heterologous desensitization (9-10).

Growth factor receptors, such as epidermal growth factor receptor (EGF-R) and platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) have intrinsic tyrosine kinase activity. Agonist binding to these receptors induces their dimerization and autophosphorylation of multiple tyrosine residues within its intracellular domain. The autophosphorylated receptor provides specific binding sites for SH2 domain-containing adaptor proteins, such as Shc and Grb2. Formation of the receptor-Shc-Grb2 complex leads to activation of the guanine nucleotide exchange factor, Sos, which in turn activates the Ras/Raf/MAP kinase cascade. Another class of receptor-associated proteins consists of enzymes, including, Src family members, the protein tyrosine phosphatases SHP-2 and SHP-1, phospholipase C γ and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (11-14).

Numerous evidences have suggested that the transmodulation of growth factor receptors represent an important event in specific responses mediated by G-protein-coupled receptors in different cell types. Thus, stimulation of Rat-1 cells with endothelin-1, lysophosphatidic acid or thrombin induces a rapid increase in tyrosine phosphorylation of EGF-R and p185^{neu}, that results in activation of the MAP Kinase. AG1478, a selective EGF-R kinase inhibitor and expression of dominant-negative EGF-R mutants, decrease the ability of these G-protein-coupled receptors to induce mitogenic responses (15, 16). In COS-7 cells the activation of G_i- or G_q-coupled receptors induces phosphorylation of EGF-R associated with assembly of Shc and Grb2 (17, 18). Angiotensin II elicits rapid phosphorylation of PDGF-R and EGF-R and subsequent formation of Shc-Grb2 complex and MAP kinase activation in vascular smooth muscle cells (19, 20). Furthermore, Ca²⁺-dependent EGF-R activation following membrane depolarization or stimulation of bradykinin receptor and nicotinic acetylcholine has been observed in PC12 cells, suggesting that the EGF-R can functions as an integrator of different Ca²⁺-mediated signals in neuronal cell (21, 22).

Although much attention has been focused on how activation of G-coupled receptors transmodulates receptors with endogenous tyrosine kinase activity, the information that exists about cross-talk from growth factor receptors to G-protein-coupled receptors is limited. Nevertheless, Malbon and coworkers (23-25) had provided ample evidence that the β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) is cross-regulated by activation of the insulin receptor. Stimulation of DDT1 MF-2 cells with insulin attenuates β_2 -AR-mediated activation of adenylyl cyclase and increases β_2 -AR receptor phosphorylation (23). Insulin promotes the phosphorylation of the β_2 -AR, both *in vivo* and *in vitro*, and the main residues for insulin-induced phosphorylation were identified at Tyr³⁵⁰, Tyr³⁵⁴ and Tyr³⁶⁴ (24, 25), indicating that the β_2 -ARs are substrates of the insulin receptor kinase activity.

The present study was designed to investigate the possible cross-talk from EGF and PDGF receptors to α_{1b} -ARs expressed in Rat-1 fibroblasts. We provided evidence that the activation of EGF and PDGF receptors leads to phosphorylation and desensitization of α_{1b} -ARs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), G418, fetal bovine serum and others reagents used for cell culture were obtained from Life Technologies Inc. (-)-Norepinephrine, staurosporine, wortmannin, Ro-318220, GDP, GTP γ S and protease inhibitors were from Sigma. PDGF-BB, EGF, tyrphostins AG1478 and AG1296 were from Calbiochem. [³⁵S]GTP γ S (1250 Ci/mmol), [³²P]P_i (8500-9120 Ci/mmol) were from NEN Life Science Products. Protein A-Sepharose beads were from Upstate Biotechnology and fura-2/AM was from Molecular Probes.

Cell Culture—Rat-1 cells transfected with the hamster α_{1b} -AR (26) were a generous gift from Drs. R.J. Lefkowitz, M.G. Caron and L. Allen (Duke University). Cells were grown at confluence in 10-cm culture dishes in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, G418 (300 μ g/ml), streptomycin (100 μ g/ml), penicillin (100 units/ml) and amphotericin B (0.25 μ g/ml) under a 5% CO₂, 95% air atmosphere at 37 °C. Cells were serum-starved overnight in all experiments.

Determination of α_{1b} -AR Phosphorylation—Rat-1 cells expressing the α_{1b} -ARs were incubated in phosphate-free DMEM for 1 h, and then labeled in the same medium containing [³²P]P_i (50 μ Ci/ml) for 3 h at 37 °C, as described previously (10). In brief, following treatment with inhibitors and agonists, as indicated, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed for 1 h on ice in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.05% SDS, 50 mM NaF, 100 μ M Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phosphoserine, 1 mM phosphothreonine and protease inhibitors (20 μ g/ml leupeptin, 20 μ g/ml aprotinin, 100 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 500 μ g/ml bacitracin, 50 μ g/ml soybean trypsin inhibitor). Cell lysates were centrifuged at 12,700 x g for 15 min and the supernants were incubated with the anti- α_{1b} -AR antiserum and protein A-Sepharose overnight at 4 °C. After five washed with 50 mM Hepes, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.05% SDS, 100 mM NaF followed by a final wash with 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, the immune complex were denatured by boiling in SDS-sample buffer containing 5% β -mercaptoetanol, and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were dried and exposed for 3-24 h at -70 °C using X-Omat x-ray films and intensifying screens. The level of receptor phosphorylation was assessed in the same gels with a Molecular Dynamics PhosphorImager and Imagequant software.

Membrane Preparation and [³⁵S]GTP γ S Binding—Confluent cells were stimulated in the absence (control) or presence of EGF (100 ng/ml) or PDGF (50 ng/ml) for 15 min at 37 °C. The reaction was terminated by washing with ice-cold PBS and addition of 1 ml of ice-cold solubilization buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 100 μ M Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, plus protease inhibitors as in lysis buffer). Membranes were prepared according to the method of Mattingly *et al.* (27). [³⁵S]GTP γ S binding was performed as described by Wieland and Jakobs (28) with minor modifications. Briefly, membranes were resuspended in binding buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 μ M GDP, 0.1% bovine serum albumin), the binding was performed at 25 °C for 30 min in a volume of 250 μ l of binding

buffer containing 0.2 nM [³⁵S]GTP γ S. The reaction was initiated by the addition of membranes (25 μ g of protein/tube) and terminated by rapid filtration through Whatman GF/C filters followed by three washes of the filters with ice-cold buffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7.5). The filters were dried and the radioactivity was measured by liquid scintillation. Nonspecific binding was determined in the presence of unlabeled GTP γ S (30 μ M) and represented 10% of total binding. Statistical analysis between comparable groups was performed using analysis of variance with Newman-Keuls post test.

RESULTS

EGF-induced Phosphorylation of α_{1b} -AR—Rat-1 cells were exposed for 5 min to vehicle (basal) or different concentrations of EGF (0.01-100 ng/ml). EGF induced the phosphorylation of α_{1b} -ARs receptor in a dose-dependent manner ($EC_{50} \sim 1$ ng/ml) with a maximal increase of 60-70% over basal (Fig 1, upper panels). The response to EGF was relatively rapid, reaching a maximum at 15-30 min and then decreased at 60 min of stimulation (Fig. 1, lower panels).

The role of the EGF-R tyrosine kinase in this effect was studied by the use of tyrphostin AG1478, a highly specific inhibitor of the EGF receptor kinase (29). Treatment of cells with AG1478 for 30 min inhibited EGF-induced phosphorylation of α_{1b} -AR in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of ~ 332 nM (Fig. 2). The response to EGF was blocked in presence of AG1478 (5 μ M) but remained unaffected by the same concentration of tyrphostin AG1296, a specific inhibitor of PDGF-R tyrosine kinase activity (Fig. 3). The inhibitors by themselves were without effect on basal receptor phosphorylation (data not shown).

EGF-mediated α_{1b} -AR Phosphorylation Occurs Through Activation of PI3K—Since PI3K is an important mediator of cellular process modulated by EGF, we examined the role of this kinase on phosphorylation of the α_{1b} -AR stimulated by EGF. Rat-1 cells were preincubated for 30 min with increasing concentrations of wortmannin (0.1-100 nM), an inhibitor of PI3K (30), followed by EGF treatment (10 ng/ml) for 5 min. Fig 4 shows that wortmannin inhibited EGF-induced α_{1b} -AR phosphorylation in a dose-dependent manner ($IC_{50} \sim 5$ nM). A consistent inhibition was detected at concentrations as low as 1 nM and an almost complete blockade was observed at 100 nM wortmannin, which is within the range of concentrations required for inhibition of PI3K activity (30). Wortmannin (100 nM) was without effect on basal receptor phosphorylation (data not shown). These results indicate that the phosphorylation of α_{1b} -ARs induced by EGF is mediated through PI3K.

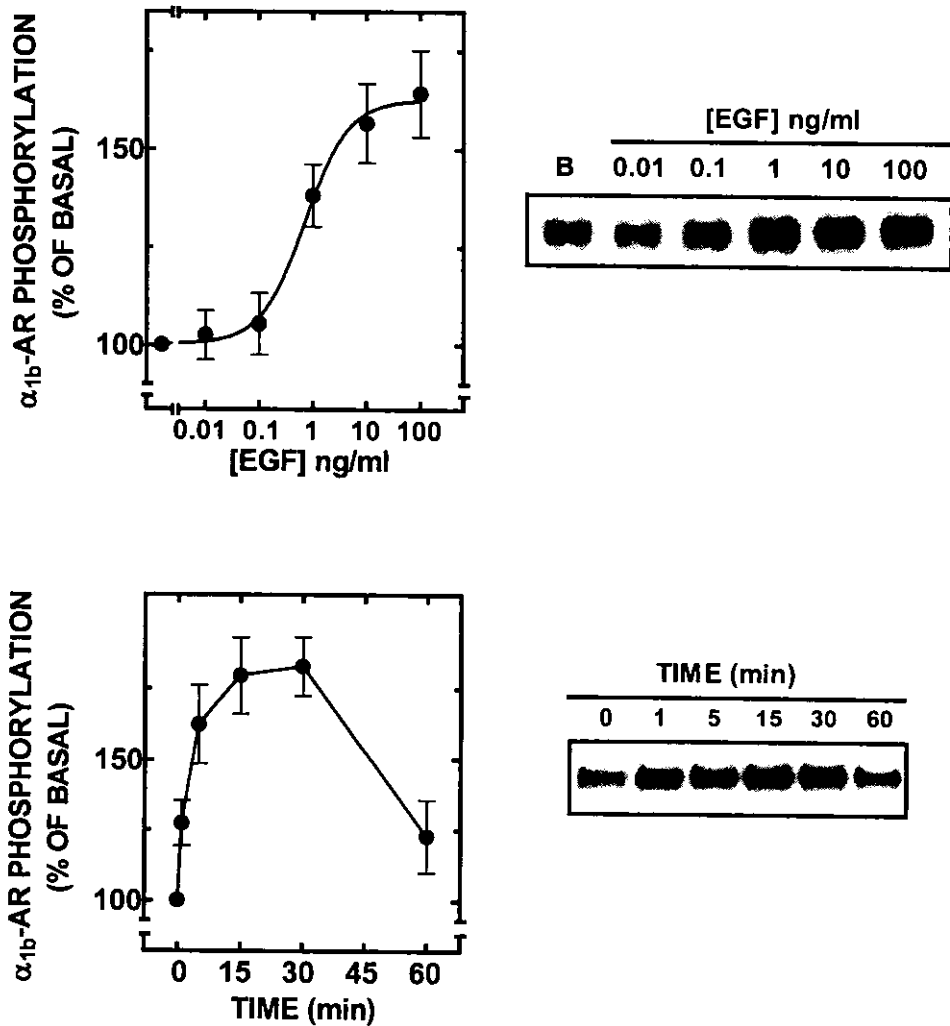


FIG. 1. Time course and dose-response of the effect of EGF on α_{1b} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P_i and incubated for the times and doses indicated of EGF. Data represent the mean \pm S.E. of 3-4 independent experiments by triplicated in each case. Representative autoradiographs for the effects of EGF are shown.

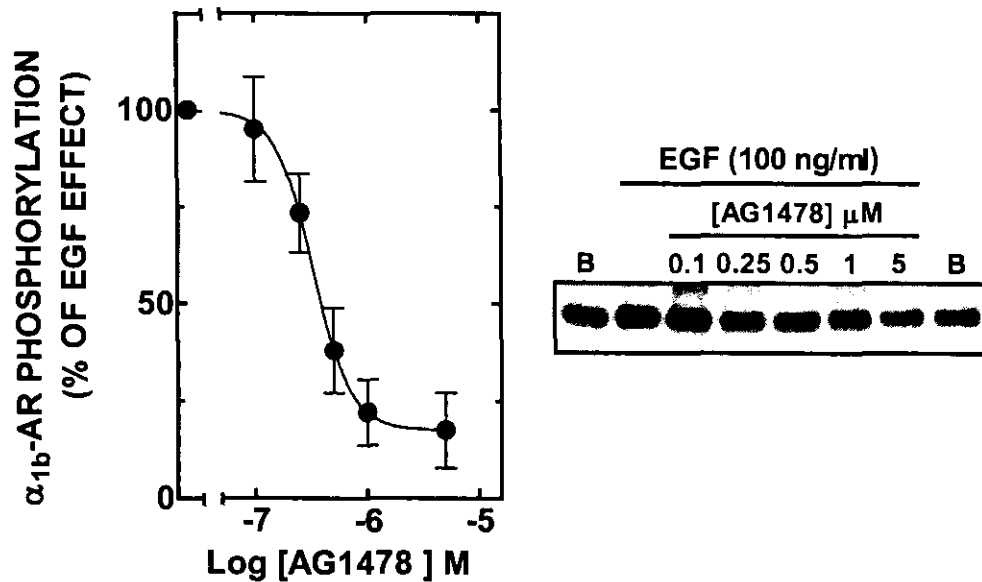


FIG. 2. Effect of AG1478 on EGF-induced phosphorylation of α_{1b} -AR. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P_i and preincubated with the doses indicated of AG1478 for 30 min before EGF (100 ng/ml) treatment. Data represent the mean \pm S.E. of 3-4 independent experiments performed by triplicated. A representative autoradiograph is presented.

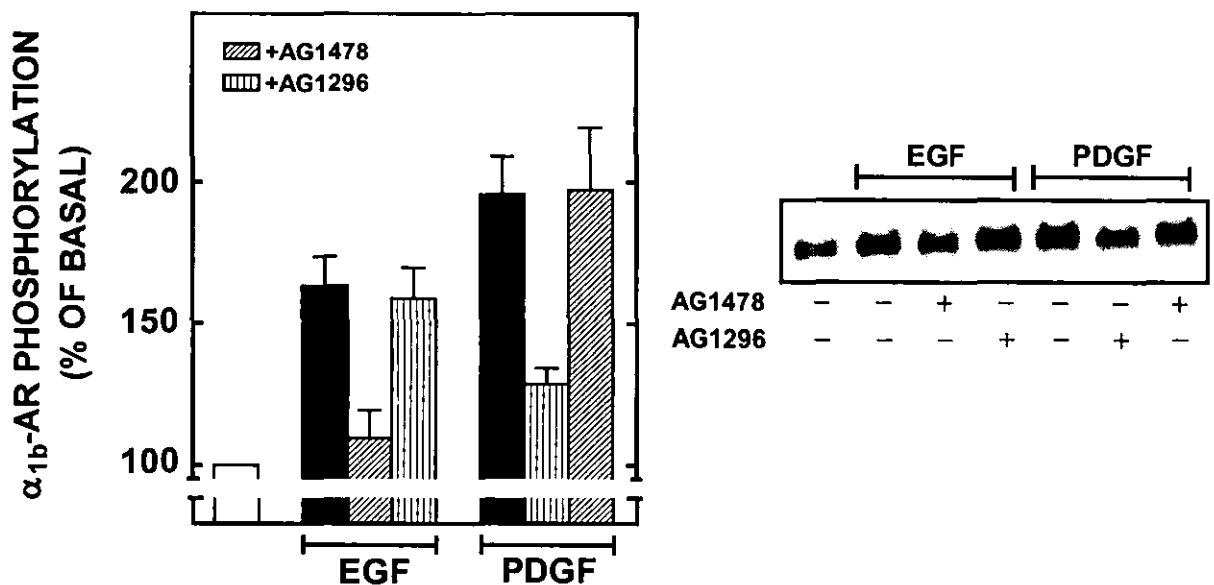


FIG. 3. Effect of AG1478 and AG1296 on EGF- and PDGF-induced phosphorylation of α_{1b} -AR. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P_i and preincubated with typhostins (5 μ M) for 30 min, followed by EGF (100 ng/ml) or PDGF (50 ng/ml) stimulation. Data represent the mean \pm S.E. of three independent experiments. A representative autoradiograph is shown.

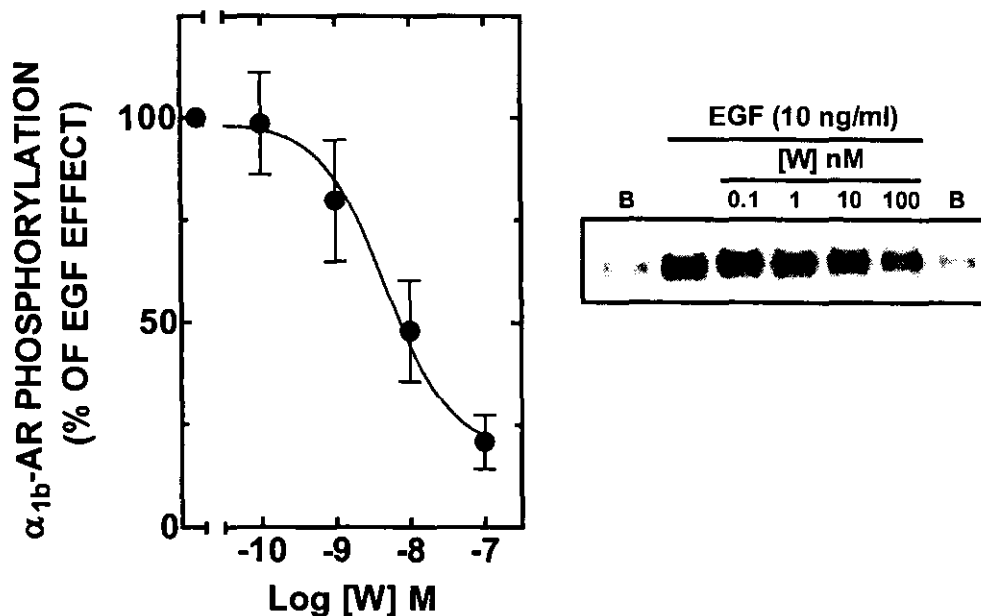


FIG. 4. Dose-response of effect of Wortmannin on EGF-induced phosphorylation of α_{1b} -AR. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P_i and preincubated at the doses indicated of wortmannin for 30 min, followed by EGF (100 ng/ml) stimulation. Data represent the mean \pm S.E. of 4-5 independent experiments. A representative autoradiograph is shown.

EGF-induced α_{1b} -AR Phosphorylation Requires Activation of PKC—Previous studies have shown PI3K-dependent activation of PKC (reviewed in 31 and 32). Therefore, we examined the contribution of PKC in the EGF signaling pathway that leads to phosphorylation of α_{1b} -ARs. Treatment of Rat-1 cells with the specific inhibitors of PKC, staurosporine and Ro 31-8220, for 30 min, reduced the EGF-stimulated phosphorylation of α_{1b} -ARs in a concentration-dependent manner. The IC₅₀ values were \sim 5 nM and \sim 12 nM for staurosporine and Ro 31-8220, respectively (Fig. 5). These data indicate that, beside PI3K, PKC significantly contributes in the EGF-mediated phosphorylation of the α_{1b} -AR.

PDGF-induced Phosphorylation of α_{1b} -AR in Rat-1 Cells—To determine whether the α_{1b} -AR phosphorylation was limited to the EGF-R or common to other receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, similar studies were performed using PDGF. Rat-1 cells were exposed to PDGF (50 ng/ml) for 5 min. Similar to EGF, PDGF markedly increased α_{1b} -AR phosphorylation. In fact, the increase in α_{1b} -AR phosphorylation induced by PDGF was 90-100% above basal (Fig. 3) consistently bigger than that induced by EGF. Treatment of the cells for 30 min with AG1296 (5 μ M), a specific inhibitor of PDGF-R tyrosine kinase activity, significantly inhibited α_{1b} -AR phosphorylation induced by subsequent exposure to PDGF (50 ng/ml) for 5 min (Fig. 3); the response of PDGF was not altered by AG1478 (Fig. 3).

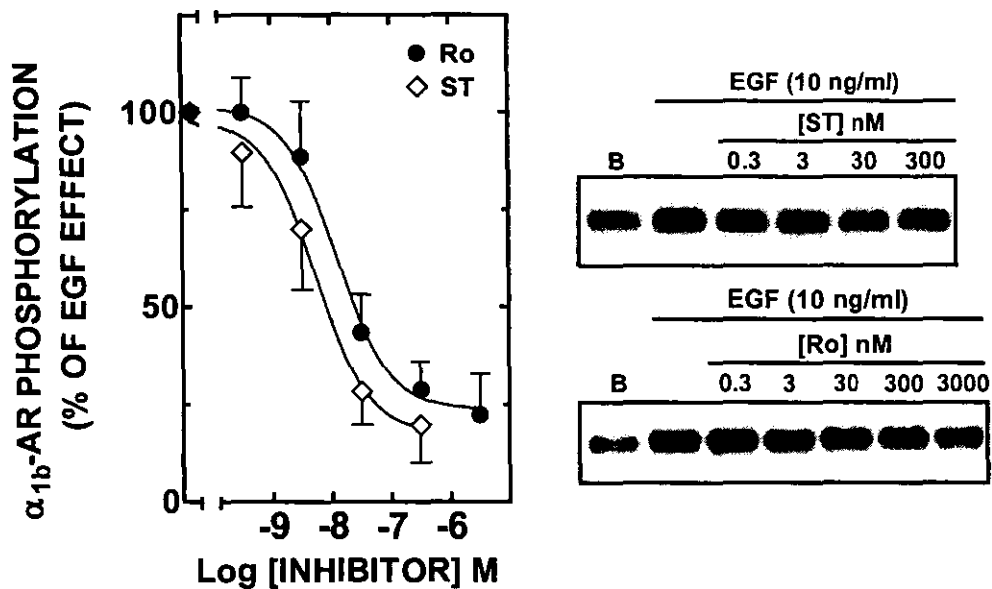


FIG. 5. Dose-response of effect of Staurosporine and Ro 31-8220 on EGF-induced phosphorylation of α_{1b} -AR. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P] P_i and preincubated at the doses indicated of staurosporine (ST) or Ro 31-8220 (Ro) for 30 min, followed by EGF (100 ng/ml) stimulation. Data represent the mean \pm S.E. of four independent experiments. Representative autoradiographs are shown.

Roles of PKC and PI3K in PDGF-induced Phosphorylation of α_{1b} -ARs—To examine the role of PI3K in the PDGF-induced α_{1b} -AR phosphorylation, we assessed the effect of PI3K inhibition by wortmannin. As shown in Fig. 6, treatment of Rat-1 cells for 30 min with 100 nM wortmannin prevented receptor phosphorylation induced by EGF, but did not affect the phosphorylation of α_{1b} -ARs in response to PDGF.

We next studied the involvement of PKC in the effect of PDGF. Rat-1 cells were incubated for 30 min with staurosporine (300 nM), followed PDGF stimulation (50 ng/ml, 5 min). The treatment with the inhibitor completely blocked α_{1b} -AR phosphorylation induced by PDGF (Fig. 6), indicating that PKC activation is a critical step in the PDGF signaling pathway that leads to phosphorylation of α_{1b} -ARs.

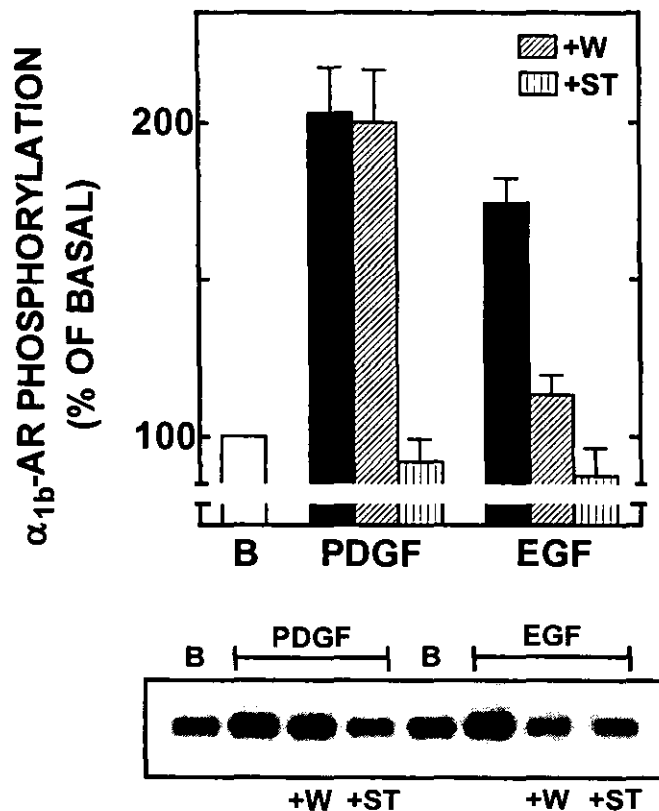


FIG. 6. Effect of Staurosporine and Wortmannin on PDGF-induced phosphorylation of α_{1b} -AR. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were metabolically labeled with [32 P]P_i and preincubated with staurosporine (ST, 300 nM) or wortmannin (WT, 100 nM) for 30 min, followed by PDGF (50 ng/ml) or EGF (100 ng/ml) stimulation. Data represent the mean \pm S.E. of three independent experiments. A representative autoradiograph is shown.

Functional significance of the phosphorylation of α_{1b} -ARs induced EGF and PDGF—The effects of EGF and PDGF on α_{1b} -AR coupling to G proteins by measuring receptor-mediated stimulation of [35 S]GTP γ S binding to membranes were studied. Membrane preparations were obtained from Rat-1 cells preincubated by 15 min in absence (control) or presence of norepinephrine (10 μ M), EGF (100 ng/ml), PDGF (50 ng/ml). As shown in Fig. 7, in membranes from control cells the norepinephrine significantly stimulated [35 S]GTP γ S binding. Norepinephrine-stimulated [35 S]GTP γ S binding was markedly decreased in the membranes from cells pretreated with the adrenergic agonist. Similarly, in membranes from cells pretreated with EGF or PDGF the increase in [35 S]GTP γ S binding induced by norepinephrine was significantly decreased (Fig. 7).

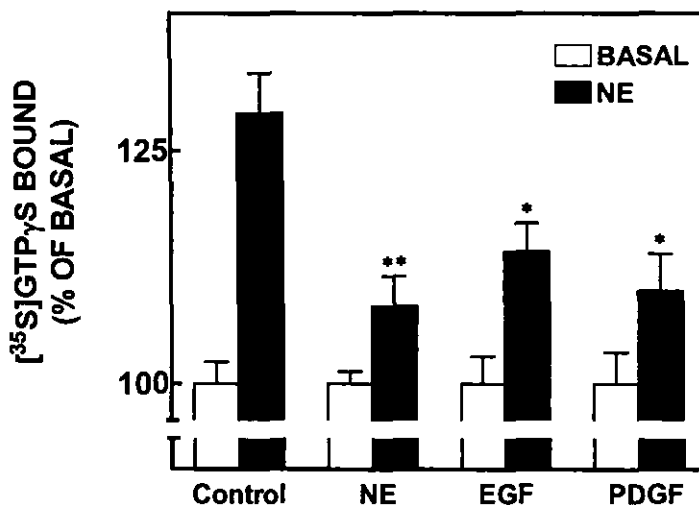


FIG. 7. *In vitro* agonist-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding to membranes from cells preincubated with agonists. Rat-1 fibroblasts expressing α_{1b} -ARs were treated for 15 min in the absence (control) or in the presence of norepinephrine (NE, 10 μ M), EGF (10 ng/ml) or PDGF (50 ng/ml) and membranes were prepared. *In vitro* [³⁵S]GTP γ S binding to membranes was performed in the presence of either vehicle (basal) or norepinephrine (NE, 10 μ M). Plotted are the means \pm the S.E. of 15-20 determinations using membranes obtained from four different cultures.

DISCUSSION

Our present data show that EGF and PDGF induce phosphorylation of α_{1b} -ARs. The adrenoceptor phosphorylation induced by these growth factors seems to involve the tyrosine kinase activities of their receptors as evidenced by the ability of tyrphostin AG1478 and AG1296 to inhibit the actions. The selectivity of these inhibitors was evidence by the absence of cross inhibition.

It is known that Rat-1 cells endogenously express functional EGF-R and PDGF-R (15, 16). Stimulation of these receptors leads to activation of their intrinsic tyrosine kinase activities and subsequently to autophosphorylation of specific residues in their intracellular domains. PI3K and other signaling and adaptor proteins, associate with phosphotyrosine residues on the receptors initiating the signaling cascades (33).

Of particular interest in our study were the roles of PI3K and PKC. PI3K is a family of enzymes, which has been grouped into three major classes. Class I PI3Ks are heterodimers composed of a catalytic subunit of 110-120 kDa and a 50-100 kDa adaptor subunit. Activation of Class I PI3Ks is controlled by receptors with intrinsic tyrosine kinase activity (Class IA) or G protein-coupled receptors (Class IB). In Class IA PI3K isoforms, the adaptor p85 subunit interacts with phosphorylated tyrosine motifs whereas PI3K γ interacts with heterotrimeric G proteins via the p101 protein (reviewed in 31).

The mechanism through which PI3K stimulates PKC activity likely involves a direct interaction with the phosphoinositides generated by PI3K. Phosphatidylinositol (3,4)-biphosphate or phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate has been reported to activate novel PKC (δ , ϵ and η) and atypical PKC (ζ and λ) isoforms (31, 32, 34). An intermediary kinase, such as the recently identified phosphoinositide-dependent protein kinase-1 or PDK1 (35, 36) may also participate in the control of PKC. PKD1, which binds with high affinity to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, phosphorylates the activation loop sites of PKC ζ and PKC δ *in vitro* and in a PI3K-dependent manner *in vivo* (37, 38). Interestingly, classical PKC α , β I and β II bind directly to PDK1 coexpressed in HEK 293 cells (37), raising the possibility of general control of the PKC family by PDK1.

Our data show that EGF induces α_{1b} -AR phosphorylation through a PI3K and PKC-dependent pathway. The almost complete inhibition of receptor phosphorylation observed in presence of either a PI3K inhibitor (wortmannin) or PKC inhibitors (staurosporine and Ro 31-8220) suggests that these enzymes act sequentially in the same signaling pathway. In accord with current ideas our data suggest that: a) EGF activates its receptor which autophosphorylates in tyrosine residues, b) this allows the association and activation of PI3K, which c) leads to activation of PKC, either via interaction with 3-phosphoinositides or phosphorylation by PDK1, and d) PKC catalyzes the phosphorylation of α_{1b} -ARs. A model is presented in Fig. 8.

We have previously shown that PKC plays an important role in the phosphorylation of α_{1b} -ARs induced by activation of endothelin ET_A receptors in these cells (10). No effect of wortmannin was observed on this action of endothelin, which is consistent with our suggestion that EGF-R transmodulation did not play a major role in this effect. However, it is clear from our data that multiple pathways may contribute to α_{1b} -AR phosphorylation and that several of them may marginally contribute to the overall effect.

The activation of PDGF-R also significantly stimulated α_{1b} -AR phosphorylation. The PDGF response was strongly attenuated by AG1296, but not affected by AG1478. Here, the PI3K inhibitor wortmannin did not block the effect of PDGF, suggesting that PI3K plays a minor role in this effect and that other pathway is involved. In contrast, treatment of cells with staurosporine before PDGF stimulation completely prevented the adrenoceptor phosphorylation. Thus, the α_{1b} -AR phosphorylation induced by PDGF clearly involved a PKC-dependent pathway. It is possible that this action of PDGF may involve activation of PLC γ . Several cellular responses induced by PDGF, such as growth and development (39), activation of PLD (40) and chemotaxis (41) occurs through PLC γ -mediated pathways. In Rat-1 fibroblasts has been reported that the serine/threonine kinase PKD act downstream of PKC in the PDGF signaling mediated by PLC γ (42, 43). It is therefore possible that PKD may participate in the α_{1b} -AR phosphorylation, a view that needs further exploration.

Our data provide evidence of differences in the growth factor signaling pathways that lead to α_{1b} -AR phosphorylation. This is not unexpected since studies in Rat-1 cells and other cell types have shown differences in the signal transduction pathways for EGF and PDGF receptors. For example, in Rat-1 cells PDGF activates PLD and phosphatidylcholine-specific PLC but EGF has no effect on this PLC activity and stimulates PLD only weakly; similarly, the activation of PLC γ induced by PDGF is much bigger than that induced by EGF (44, 45).

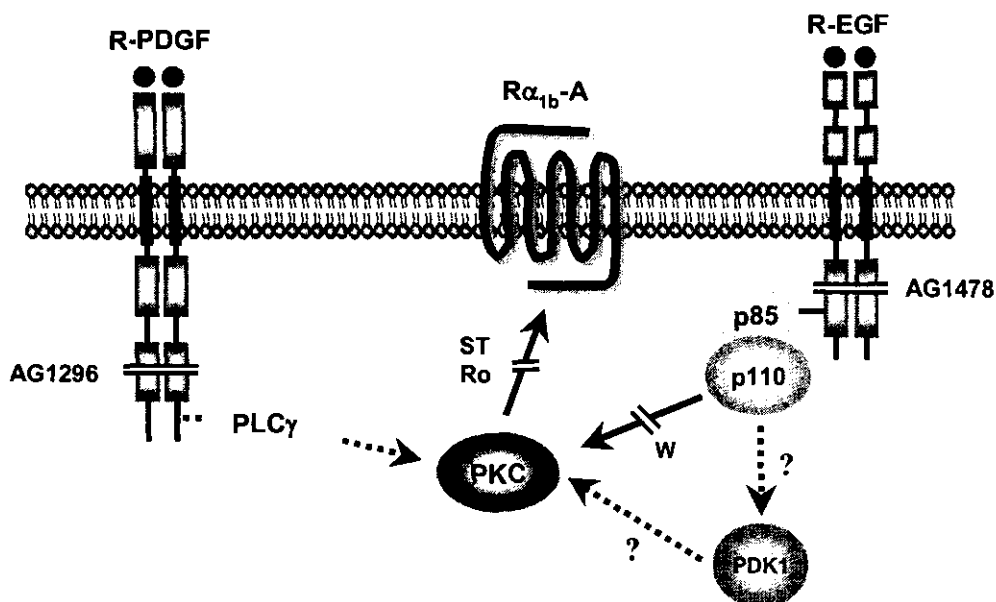


FIG. 8. Model of Regulation Mechanisms of EGF and PDGF-induced Phosphorylation of α_{1b} -AR.

The phosphorylation of α_{1b} -AR promoted by EGF and PDGF was associated to receptor desensitization, as evidenced by the [35 S]GTP γ S binding assays. The data show that pretreatment of the cells with EGF and PDGF induced a substantial reduction in the coupling efficiency of α_{1b} -ARs and G proteins. This is relevant since not all α_{1b} -AR phosphorylations are clearly associated to desensitization (46).

In conclusion, our data indicate that: 1) activation of EGF and PDGF receptors promote phosphorylation of α_{1b} -ARs, 2) PI3K is involved in the EGF response, but does not seem to play a major role in the action of PDGF, 3) PKC plays a important role in mediating this action of both growth factors, and 4) the phosphorylation of α_{1b} -AR induced by EGF and PDGF leads to adrenoceptor desensitization. These results indicate that a cross-talk exists between the pathways activated by EGF- and PDGF-receptors and α_{1b} -ARs in Rat-1 fibroblasts. This process could be of physiological relevance in the regulation of cell responsiveness to adrenergic agonists.

Acknowledgements—The authors are grateful to Drs. R. J. Lefkowitz, M. G. Caron and L. Allen for the generous donation of the transfected Rat-1 fibroblasts.

Footnotes

* This research was partially supported by Grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN 200596) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (27569N).

¹ The abbreviations used are: α_{1b} -AR, α_{1b} -adrenergic receptor; EGF-R, EGF receptor; PDGF-R, PDGF receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GRK, G protein-coupled receptor kinase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; PDK1, phosphoinositide-dependent protein kinase-1.

REFERENCES

1. Lefkowitz, R. J., and Caron, M. G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4993-4996
2. Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J., and Piasck, M. T. (1996) *Circ. Res.* **78**, 737-749
3. Minneman, K. P., and Esbenshade, T. A. (1994) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 117-133
4. Premont, R. T., Inglese, J., and Lefkowitz, R. J. (1995) *FASEB J.* **9**, 175-182
5. Pitcher J.A., Freedman, N.J., and Lefkowitz, R.J. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 653-692
6. Krupnick, J.G., and Benovic, J.L. (1998) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 279-319
7. Hausdorff, W.P., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990) *FASEB J.* **4**, 2881-2889
8. Diviani, D., Lattion, A.-L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J. L., and Cotecchia, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 5049-5058
9. Lattion, A.-L., Diviani, D., and Cotecchia, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22887-22893
10. Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., and García-Sáinz, J.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27330-27337
11. Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) *Cell* **61**, 203-212
12. Panayotou, G. and Waterfield, M.D. (1993) *BioEssays* **15**, 171-177
13. Yu, Z., Su, L., Hoglinger, O., Jaramillo, M.L., Banville, D., and Shen., S-H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3687-3694
14. Keilhack, H., Tenev, T., Nyakatura, E., Godovac-Zimmermann, J., Nielsen, L., Seedorf, K., and Böhmer, F.D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24839-24846
15. Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., and Ullrich, A.. (1996) *Nature* **379**, 557-560.
16. Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G., and Gudermann, T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8985-8990
17. Luttrell, L. M., Della Rocca, J.G., van Biesen, T., Luttrell D.K., and Lefkowitz R.J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4637-4644.
18. Daub, H., Wallasch, C., Lanckenau, A., Herrlich, A., and Ullrich, A. (1997) *EMBO J.* **16**, 7032-7044.
19. Linseman, D.A, Benjamin, C.W., and Jones, D.A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12563-12568
20. Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E.D., Kawakatsu, H., Owada, K.M., Hirata, Y., Marumo, F., and Inagami, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8890-8896.
21. Rosen, L.B., and Greenberg, M.E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 1113-1118

22. Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K., and Ullrich, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24767-24770.
23. Hadcock, J.R., Port, J.D., Gelman, M.S., and Malbon, C.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 26017-26022
24. Karoor, V., Baltensperger, K., Paul, H., Czech, M.P., and Malbon, C.C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25305-25308
25. Baltensperger, K., Karoor, V., Paul, H., Ruoho, A., Czech, M.P., and Malbon, C.C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 1061-1064
26. Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randall, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., and Kobilka, B. K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 7159-7163
27. Mattingly, R.R., Wasilenko, W.J., Woodring, P.J., and Garrison, J.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 7470-7477
28. Wieland, T., and Jakobs, K.H. (1994) *Methods Enzymol.* **237**, 3-13
29. Levitzki, A. and Gazit, A. (1995) *Science* **267**, 1782-1788
30. Ui, M., Okada, T., Hazeki, K., and Hazeki, O. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 303-307
31. Wymann, M.P., and Pirola, L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 127-150
32. Rameh, L.E., and Cantley, L.C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 8347-8350
33. Marshall, C.J. (1995) *Cell* **80**, 179-185
34. Nakanishi, H., Brewer, K.A., and Exton, J.H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13-16
35. Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., and Hawkins, P.T. (1998) *Science* **279**, 710-714
36. Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A., and Bownes, M. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 776-789
37. Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.V., Alessi, D.R., Cohen, P., and Parker, P.J. (1998) *Science* **281**, 2042-2045
38. Chow, M.M., How, W., Johnson, J., Graham, L.K., Lee, M.H., Chen, C.S., Newton, A. C., Schaffhausen, B.S., and Toker, A. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 1069-1077
39. Ji, Q.-S., Winnier, G.E., Niswender, K.D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnusom, M.A., and Carpenter, G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2999-3003
40. Yeo, E.J., Kazlauskas, A., and Exton, J.H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27823-27826
41. Higaki, M., Sakaue, H., Ogawa, W., Kasuga, M., and Shimokado, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **271**, 29342-29346
42. Zugaza, J.L., Sinnet-Smith, J., Van Lint, J., and Rozengurth, E. (1996) *EMBO J.* **15**, 6220-6230
43. Van Lint, J., Ni, Y., Valius, M., Merlevede, W., and Vandenhede, J.R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 7038-7043
44. van Dijk, M.C., Muriana, F.J.G., de Widt, J., Hilkmann, H., and van Blitterswijk, W.J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11011-11016
45. Hess, J.A., Ross, A.H., Qiu, R.-G., Symons, M., and Exton J.H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1615-1620
46. Medina, L.C., Vázquez-Prado, J., Torres-Padilla, M. E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz-Muñoz, M.E., and García-Sáinz, J.A. (1998) *FEBS Lett.* **422**, 141-145

DISCUSION

Los resultados de esta tesis demuestran que los receptores α_{1B} -adrenérgicos son modulados por diferentes estímulos no adrenérgicos. Este tipo de regulación heteróloga ("cross-talk") es ejercida no sólo por receptores que se acoplan a proteínas G (endotelina y bradicinina) sino también por receptores con actividad de cinasa de tirosina (EGF y PDGF). La fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico es incrementada por la activación de estos receptores, aunque existen diferencias en la magnitud del efecto y en las consecuencias funcionales sobre la actividad del receptor. La mayor estimulación de la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico es producida por la endotelina y la de menor magnitud por la bradicinina. La modificación del receptor inducida por la activación de los receptores de endotelina, EGF y PDGF se correlaciona con la desensibilización del receptor adrenérgico, pero el efecto no es promovido por los receptores de bradicinina.

Regulación del Receptor α_{1B} -Adrenérgico por la Endotelina

Se ha descrito que la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por el agonista es mediada principalmente por las GRKs (GKK2 y GRK3), mientras que la PKC interviene en la respuesta estimulada por los ésteres del forbol (TPA) (Lattion y col., 1994; Diviani y col., 1996). Nuestros resultados confirman esta idea, ya que: a) la norepinefrina (NE) indujo un incremento significativo en la fosforilación del receptor, que fue insensible al bloqueo de la actividad de PKC con el inhibidor estaurosporina y b) la estimulación directa de la enzima con TPA produjo una respuesta mayor que la de NE.

Los fibroblastos Rat-1 expresan endógenamente receptores de endotelina que se acoplan a la proteína $G_{q/11}$ y aumentan el recambio de fosfoinosítidos. Nuestros resultados muestran que **la estimulación con endotelina incrementa significativamente el nivel de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico**; la respuesta fue más rápida y de mayor magnitud que la inducida por la NE. **La endotelina ejerce su acción por activación de los receptores ET_{1A}** , ya que la respuesta fue suprimida por el antagonista selectivo BQ123.

La observación de que la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico estimulada por la endotelina es inhibida parcialmente con los inhibidores de la PKC (estaurosporina) y de cinasas de tirosina (genisteína) y bloqueada casi totalmente por la acción combinada de ambos inhibidores, sugiere la participación de ambos tipos de cinasas en el proceso. Las células Rat-1 expresan diferentes isoenzimas de PKC (α , δ , ϵ y ζ) y la endotelina induce la translocación rápida a la membrana plasmática de la PKC α , δ y ϵ (García-Sáinz y Alcántara-Hernández, 1998), lo que sugiere que estas isoenzimas pueden ser las responsables de la modificación del receptor.

Por su parte, la actividad de cinasa sensible a genisteína puede corresponder a algún miembro de la familia de las cinasas Src. En miocitos cardíacos de rata la endotelina promueve la activación rápida de Src, Yes y Fyn a los pocos minutos de estimulación y la respuesta es bloqueada por genisteína (Kovačič y col., 1998). Un dato importante es que la PKC δ es fosforilada en tirosina en respuesta a diferentes estímulos, como el carbacol, sustancia P,

citocinas, factores de crecimiento y ésteres del forbol. La fosforilación en tirosina de la enzima se ha atribuido a la acción de las cinasas Src y Fyn (Li y col., 1994; Soltoff y Toker, 1995; Denning y col., 1996; Zang y col., 1997).

Esta información permite proponer que la endotelina, mediante la estimulación de cinasas de tirosina Src, aumenta la actividad de isoenzimas específicas de PKC que fosforilan al receptor α_{1B} -adrenérgico (Fig. 5).

Los mecanismos que intervienen en la activación de Src por los receptores acoplados a la proteína $G_{q/11}$ no se han determinado. Sin embargo, se ha sugerido que la estimulación de las cinasas Src producida por bradicinina y bombesina requiere de la participación de fosfatasa de tirosina, ya que la activación de las cinasas Src es bloqueada por la inhibición de la actividad de estas fosfatasas. La cinasa de adhesión focal (FAK) también parece intervenir en la estimulación de Src mediada por los receptores acoplados a $G_{q/11}$. En cultivos primarios de astrocitos, la endotelina induce la fosforilación en tirosina y activación de FAK y en células Swiss 3T3 el tratamiento con bombesina, bradicinina y endotelina incrementa la asociación de FAK con Src. La unión de FAK a Src puede alterar las interacciones intramoleculares de los dominios SH2 y SH3 que mantienen a la enzima en su conformación inactiva y producir su activación (Rodríguez-Fernández y Rozengurt, 1996; Cazaubon y col., 1997; Thomas y col., 1998; Salazar y Rozengurt, 1999).

El análisis de fosfoaminoácidos del receptor α_{1B} -adrenérgico fosforilado por la endotelina reveló cantidades elevadas de residuos de fosfoserina, niveles bajos de fosfotreonina, pero no se detectó fosfotirosina. Esto apoya el punto de vista de que la(s) cinasa(s) de tirosina activada(s) por la endotelina actúan en un paso previo a la estimulación de la PKC, que es la responsable de catalizar la fosforilación del receptor. Además, se ha demostrado la fosforilación por PKC de residuos de serina específicos (Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰) localizados en el carboxilo terminal del receptor α_{1B} -adrenérgico (Diviani y col., 1997).

La fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por la endotelina se asocia con la disminución en la actividad del receptor. Tanto la movilización de Ca^{2+} intracelular, como el nivel de acoplamiento del receptor a la proteína $G_{q/11}$ estimulados por la NE fueron reducidos significativamente por el pretratamiento con endotelina. El efecto de la endotelina fue prevenido por estaurosporina y genisteína, lo que confirma la participación de tirosina(s) cinasa(s) y de la PKC en la regulación del receptor.

El papel de la PKC en la regulación heteróloga ejercida por los receptores ET_{1A} también se ha demostrado en el caso de los receptores de angiotensina. En células HEK 293 transfectadas con los receptores ET_{1A} y AT_{1A} , el pretratamiento con endotelina inhibe la activación de la $PKC\beta II$ producida por los receptores AT_{1A} . Por su parte, la estimulación de los receptores AT_{1A} no modifica la respuesta de los receptores ET_{1A} , lo que sugiere la acción selectiva de la PKC en la desensibilización heteróloga de receptores particulares (Feng y col., 1998).

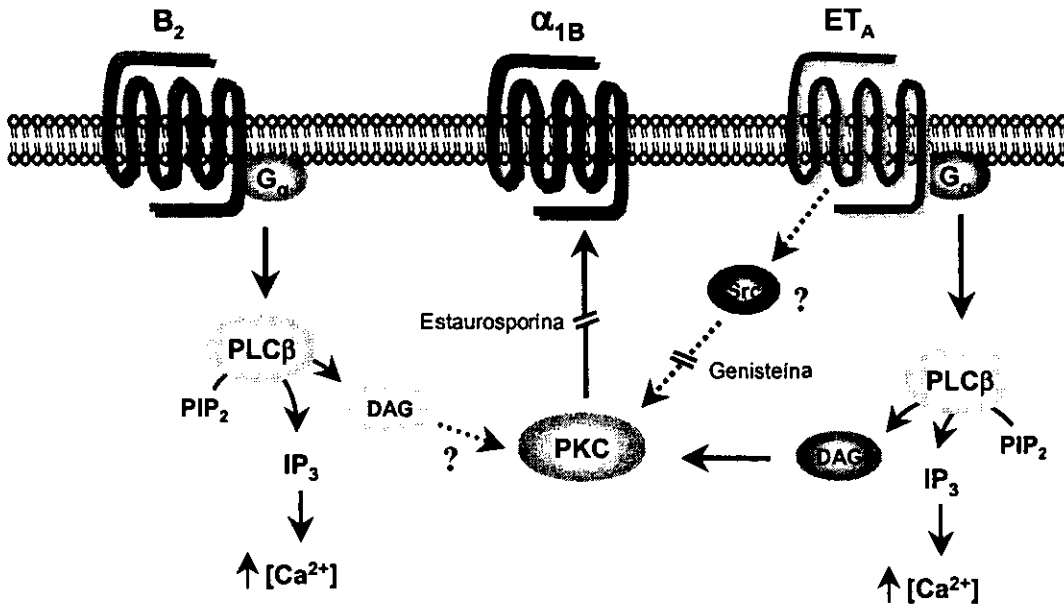


Fig. 5 Modelo de los Mecanismos de Regulación de los Receptores de Endotelina y Bradicinina sobre el Receptor α_{1B} -Adrenérgico

La especificidad en el “cross-talk” entre distintos receptores acoplados a la proteína $G_{q/11}$ puede depender de la acción de isoenzimas específicas de PKC. La variación en la expresión celular de distintas isoenzimas de PKC y en la selectividad por el sustrato de las cinasas individuales puede traducirse en diferencias en la fosforilación y desensibilización heteróloga de receptores particulares.

La unión de las isoenzimas de PKC con proteínas de anclaje suministra un mecanismo para la regulación de su actividad y especificidad por el sustrato. En estado inactivo las PKCs se localizan en el citosol y cuando el sistema es activado se translocan a diferentes sitios subcelulares, mediante la unión a las proteínas RACKs (receptores para cinasas C activadas). La estimulación de la enzima induce un cambio conformacional que expone sus sitios autorreguladores pseudo-RACK y pseudo-sustrato y permite la unión de RACK. Además de promover la translocación de la PKC, las RACKs pueden incrementar su actividad catalítica, mediante la estabilización de la forma activa de la enzima. La compartimentalización intracelular restringe la acción de isoformas de PKC individuales sobre sustratos definidos, lo que probablemente determina la especificidad fisiológica de estas cinasas. Se han identificado RACKs que interactúan selectivamente con la $PKC\beta_{II}$ (RACK1) o con la $PKC\epsilon$ (RACK2) y se ha planteado que existen RACKs específicas para cada una de las isoenzimas de PKC (Ron y col., 1994, 1995; Mochly-Rosen, 1995; Csukai y col., 1997).

La distribución subcelular de las isoformas de PKC puede variar de acuerdo al tipo celular y a la naturaleza del estímulo. Por ejemplo, en células NIH 3T3 transfectadas con diferentes isoenzimas de PKC, el tratamiento con TPA induce la translocación de la $PKC\alpha$ y $PKC\epsilon$ a la membrana plasmática y de la $PKC\beta_{II}$ a filamentos de actina; en las células β pancreáticas la

PKC α y PKC ϵ son translocadas a la membrana plasmática por la estimulación con glucosa y en miocitos cardiacos la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos promueve la movilización de la PKC β I al núcleo, de la PKC β II a la región perinuclear y a la membrana plasmática y de la PKC ϵ a filamentos de actina. La diversidad en la localización subcelular probablemente se correlaciona con respuestas celulares particulares mediadas por cada una de las isoformas de PKC (Goodnight y col., 1995; Mochly-Rosen, 1995; Yedovitzky y col., 1997).

Una estrategia que se utiliza para determinar el papel de isoenzimas de PKC individuales es el bloqueo selectivo de la translocación con péptidos que contienen la secuencia de unión de RACK presente en la enzima. De esta forma, se ha descrito la participación de la PKC α y PKC ϵ en la secreción de insulina inducida por glucosa en células β pancreáticas, de la PKC ϵ y PKC δ en la regulación de las respuestas inducidas por el factor de crecimiento neuronal o por TPA en células PC12 y de la PKC β en la inhibición de la actividad de los canales de Ca $^{2+}$ tipo L inducida por TPA en miocitos cardiacos (Hundle y col., 1997; Yedovitzky y col., 1997; Zhang y col., 1997).

Regulación del Receptor α_{1B} -Adrenérgico por la Bradicinina

Ya que existen reportes contradictorios acerca de la expresión y actividad de los receptores de bradicinina en diferentes clonas de fibroblastos Rat-1 (Roberts y Gullick., 1989; Prado y col., 1997), se determinó la presencia de estos receptores en los fibroblastos Rat-1 transfectados con el receptor α_{1B} -adrenérgico, valorando la movilización de calcio intracelular y la producción de fosfatos de inositol-[3 H] en respuesta a la estimulación con bradicinina. Los resultados muestran que **los receptores de bradicinina (el subtipo B $_2$) se expresan endógenamente en los fibroblastos Rat-1 y que su activación aumenta el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio intracelular.**

La activación de los receptores B $_2$ con los agonistas bradicinina y kalidina aumentó la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico y el efecto fue bloqueado por el antagonista selectivo HOE 140. Sin embargo, la magnitud de la respuesta fue mucho menor que la producida por la endotelina. Aún cuando no se investigó cuáles son las enzimas que intervienen en la fosforilación del receptor, la demostración de que la bradicinina aumenta el recambio de fosfoinosítidos e induce la movilización de Ca $^{2+}$ intracelular, sugiere que la PKC puede tener un papel importante. Además, se ha descrito que la bradicinina activa isoenzimas específicas de PKC en células Rat-1 y en otros tipos celulares (Chen y col., 1995; Levesque y col., 1997; García-Sáinz y Alcántara-Hernández, 1998) (Fig. 5).

La fosforilación de los receptores α_{1B} -adrenérgicos producida por la activación de los receptores B $_2$ no induce su desensibilización. El efecto de la NE sobre la movilización de Ca $^{2+}$ intracelular no fue modificado por el pretratamiento de las células con bradicinina, mientras que en las mismas condiciones la endotelina claramente disminuyó la respuesta. Es probable que la magnitud de la señal desencadenada por los receptores B $_2$ no sea suficiente para inhibir la actividad del receptor o que realmente la modificación del receptor inducida por los receptores de bradicinina no promueva su desensibilización. Existen ciertos antecedentes

que sugieren que este puede ser el caso, ya que se ha reportado que las cinasas GRK5 y GRK6 aumentan significativamente la fosforilación de los receptores α_{1B} -adrenérgicos sin modificar su actividad (Diviani y col., 1996). Por lo tanto, una conclusión importante es que **no todos los estímulos que aumentan la fosforilación del receptor promueven su desensibilización.**

La contribución de la fosforilación del receptor en el proceso de desensibilización puede variar en diferentes receptores acoplados a proteínas G. Por ejemplo, en células HEK 293 transfectadas con el receptor μ -opioide, la estimulación con el agonista induce un incremento rápido en la fosforilación del receptor, que no se correlaciona con la desensibilización de la inhibición de la adenilato ciclasa mediada por el receptor. La sobreexpresión de GRK3 y β -arrestina 2 aumenta significativamente el nivel de fosforilación del receptor, pero no modifica la desensibilización inducida por el agonista. Al igual que para los receptores serotoninérgicos 5HT₂ y sst_{2B} de somatostatina, la internalización del receptor parece ser el mecanismo principal de la desensibilización de los receptores μ -opioides (Vouret-Craviari y col., 1995; Beaumont y col., 1998; El Kouhen y col., 1999).

En el caso de la desensibilización del receptor de LH en membranas de folículos ováricos, que ocurre de manera independiente de la fosforilación del receptor, la unión de la β -arrestina al receptor es suficiente para bloquear la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por el agonista. De igual forma, la unión de las GRKs al receptor de la hormona paratiroidea es capaz de inhibir el recambio de fosfoinosítidos inducido por el agonista, en ausencia de la fosforilación del receptor; la sobreexpresión de una mutante dominante negativa de la GRK2 bloquea la respuesta del receptor silvestre y de una mutante del receptor que no presenta los sitios de fosforilación para las GRKs, PKA y PKC. Así, en algunos sistemas la desensibilización puede ser mediada por la asociación de las GRKs y/o de las arrestinas con el receptor, que directamente impiden el acoplamiento con la proteína G e inhiben la transducción de la señal (Lamm y col., 1994; Mukherjee y col., 1999; Dicker y col., 1999).

En estudios recientes se ha explorado la posibilidad de que otras proteínas accesorias puedan interactuar con regiones específicas del receptor y modular su actividad. Se ha identificado una proteína denominada ATRAP (proteína asociada al receptor AT₁) que se une al carboxilo terminal del receptor AT_{1A} de angiotensina. Esta proteína interactúa específicamente con el receptor AT_{1A}, pero no se une a los receptores AT₂ de angiotensina, muscarínicos m₃, B₂ de bradicinina, ET_{1B} de endotelina o β_2 -adrenérgicos. La sobreexpresión de ATRAP en células COS-7 transfectadas con el receptor AT_{1A} inhibe la estimulación de la PLC β inducida por la activación del receptor. Asimismo, se ha descrito que la proteína reguladora de complemento, gC1q-R (receptor para las cabezas globulares de C1q) se une a la región rica en arginina del carboxilo terminal del receptor α_{1B} -adrenérgico y esta interacción produce la redistribución del receptor de la membrana plasmática al citosol y reduce su nivel de expresión ("down regulation") (Daviet y col., 1999; Xu y col., 1999).

Esta información indica la diversidad en los mecanismos de regulación de la actividad de los receptores acoplados a proteínas G. La asociación de distintas proteínas citosólicas con regiones específicas del receptor puede determinar las características particulares de modulación del receptor.

Regulación del Receptor α_{1B} -Adrenérgico por el EGF y PDGF

Se ha demostrado que distintos receptores acoplados a proteínas G, incluyendo a los α_{1B} -adrenérgicos, ET_A de endotelina y B_2 de bradicinina, intervienen en la traducción de señales mitogénicas en diferentes tipos celulares. Las respuestas mitogénicas se han asociado a la activación de los receptores con actividad de cinasa de tirosina. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias que demuestran un nivel importante de "cross-talk" entre las vías de transducción desencadenadas por ambas clases de receptores y se ha descrito que la transmodulación de los receptores de EGF y PDGF es un mecanismo por el cual los receptores acoplados a proteínas G producen sus acciones mitogénicas.

Aunque existe poca información, también se ha demostrado que los receptores acoplados a proteínas G pueden ser modulados por receptores con actividad de cinasa de tirosina. Un ejemplo que se ha estudiado en detalle es el receptor β_2 -adrenérgico, que es fosforilado y desensibilizado por la acción de insulina (Malbon y Karoor, 1998).

Los receptores de EGF y PDGF se expresan endógenamente en las células Rat-1 (Daub y col., 1996), por lo que se examinó su posible acción moduladora sobre el receptor α_{1B} -adrenérgico. **La estimulación con EGF y PDGF incrementó significativamente la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico.** La respuesta requiere de la actividad de cinasa de tirosina de los receptores de EGF y PDGF, ya que fue suprimida con los antagonistas específicos AG1478 y AG1296, respectivamente.

La unión del agonista a moléculas receptoras individuales induce su dimerización y autofosforilación de residuos de tirosina específicos, a los que se unen distintas proteínas adaptadoras y efectoras, como las cinasas PLC γ y PI3K, que intervienen en la transducción de la señal. La PLC γ estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos y la activación de la PKC, mientras que la PI3K produce los segundos mensajeros PI(3,4)P $_2$ y PI(3,4,5)P $_3$ (Schlessinger y Ullrich, 1992; Rhee y Bae, 1997; Rameh y Cantley, 1999).

El EGF induce la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico por una vía que involucra a las cinasas PI3K y PKC. El bloqueo casi total de la fosforilación del receptor en presencia del inhibidor selectivo de la PI3K (wortmanina) o de los inhibidores de la PKC (estaurosporina y Ro-318220) sugiere la acción secuencial de estas enzimas en la vía de transducción de la señal del receptor de EGF. La PI3K activada probablemente estimula a la PKC, que a su vez fosforila al receptor α_{1B} -adrenérgico.

Es probable que la activación de la PKC ocurra por la interacción directa con el PI(3,4)P $_2$ y el PI(3,4,5)P $_3$, generados por la PI3K. Se ha demostrado que estos fosfoinosítidos son capaces de activar a isoenzimas de PKC nuevas (δ , ϵ y η) y atípicas (ζ y λ) (Nakanishi y col., 1993; Toker y col., 1994). Una cinasa intermediaria, como la proteína cinasa-1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) también puede intervenir en el control de la PKC. La PDK1 se une con alta afinidad al PI(3,4,5)P $_3$ y fosforila a la PKC ζ y PKC δ "in vitro" y de manera dependiente de PI3K "in vivo". Además, las PKCs clásicas (α , βI y βII) se unen directamente a la PDK1, lo que sugiere que la enzima puede ejercer un control general sobre diferentes isoenzimas de la PKC (Alessi y col., 1997; Stephens y col., 1998; Le Good y col., 1998; Chow y col., 1998).

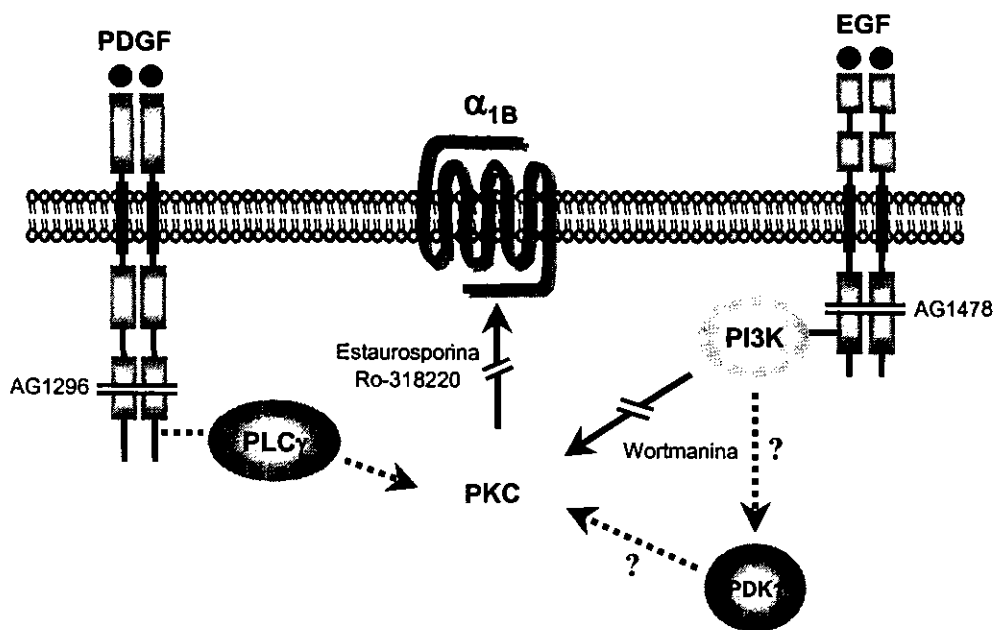


Fig. 6 Modelo de los Mecanismos de Regulación de los Receptores de EGF y PDGF sobre el Receptor α_{1B} -Adrenérgico

A partir de esta información se puede proponer un modelo para explicar los eventos que conducen a la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico mediada por el EGF. La unión del EGF a su receptor promueve la autofosforilación en residuos de tirosina, lo que permite la asociación y activación de la PI3K. El PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃ pueden estimular, de manera directa o mediante la activación de la PDK1, a la PKC que cataliza la fosforilación del receptor de α_{1B} -adrenérgico (Fig. 6).

El receptor de PDGF utiliza una vía diferente para promover la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, en la cual la PKC es esencial y la PI3K no contribuye de manera importante. La acción del PDGF fue suprimida totalmente en presencia de estaurosporina, pero no fue modificada por el tratamiento con wortmanina. El bloqueo de la respuesta por la estaurosporina fue consistentemente mayor que el obtenido sobre el efecto del EGF. El PDGF tal vez ejerce su acción mediante la estimulación de la PLC γ , hidrólisis de fosfoinosítidos y activación de la PKC. La PLC γ es activada como resultado de la interacción de uno de sus dominios SH2 con la pTyr¹⁰²¹ del receptor activado y la fosforilación en tirosina de la enzima por el dominio cinasa del receptor. Varias de las respuestas celulares inducidas por el PDGF, como el crecimiento, desarrollo y quimiotaxis son mediadas principalmente por la activación de esta vía (Yeo y col., 1994; Higaki y col., 1996; Ji y col., 1997).

Existen evidencias de que en varios tipos celulares, incluyendo a los fibroblastos Rat-1, la proteína cinasa D (PKD) actúa en un paso posterior a la PKC, en la vía de transducción de la señal del receptor de PDGF mediada por la PLC γ . La PKD es fosforilada y activada "in vitro" por ésteres del forbol o DAG y en células intactas la estimulación con agonistas mitogénicos,

que promueven el recambio de fosfoinosítidos y la formación de DAG, incrementa la actividad de la enzima por un mecanismo dependiente de PKC. Mediante la cotransfección de PKD con diferentes mutantes constitutivamente activas de diferentes isoformas de PKC se ha demostrado que la PKD es estimulada específicamente por isoenzimas de PKC nuevas (PKC ϵ y PKC η). En células Swiss 3T3 el tratamiento con PDGF aumenta la actividad de la PDK mediante la estimulación de la PLC γ , formación de DAG y activación de la PKC (Zugaza y col., 1996, 1997; Van Lint y col., 1998).

Esta información permite sugerir la posible participación de la PKD en la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por el PDGF, lo que sería interesante confirmar en un estudio posterior (Fig. 6).

Los resultados indican que el EGF y el PDGF activan vías diferentes para la regulación del receptor α_{1B} -adrenérgico en las células Rat-1. Se han descrito diferencias en la estimulación de otras vías de transducción de la señal por estos factores de crecimiento. Por ejemplo, en los fibroblastos Rat-1 y otros tipos celulares, el PDGF activa a la fosfolipasa D (PLD) y a la fosfolipasa específica para fosfatidilcolina (PLC-C), pero el EGF no modifica la actividad de la PLC-C y sólo estimula ligeramente a la PLD. Un dato importante es que la activación de la PLC γ inducida por PDGF es mucho mayor que la producida por el EGF, lo que apoya el punto de vista de la participación de esta enzima en la acción moduladora del PDGF sobre el receptor α_{1B} -adrenérgico (Yeo y col., 1994; Yeo y Exton, 1995; Zugaza y col., 1996; Hess y col., 1997; van Dijk y col., 1997).

Los estudios funcionales muestran que **la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por el EGF y PDGF se correlaciona con su desensibilización.** El tratamiento con EGF y PDGF redujo significativa el nivel de acoplamiento del receptor con la proteína G $_{q/11}$ inducido por la NE.

En **conclusión**, los resultados de este estudio indican que en fibroblastos Rat-1 los receptores α_{1B} -adrenérgicos son fosforilados significativamente como consecuencia de la activación de los receptores ET $_{1A}$ de endotelina y en menor grado por la estimulación de los receptores B $_2$ de bradicinina. La acción de los receptores ET $_{1A}$ es mediada por la activación secuencial de cinasas de tirosina y de la PKC, que cataliza la fosforilación principalmente de residuos de serina del receptor. La modificación del receptor inducida por los receptores ET $_{1A}$, pero no por los B $_2$ de bradicinina, promueve su desensibilización. Un incremento importante en el nivel de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, que se correlaciona con la disminución en su actividad, también se presenta en respuesta a la estimulación de receptores con actividad de cinasa de tirosina, como los de EGF y PDGF. Diferentes mecanismos intervienen en los efectos moduladores de estos factores de crecimiento; la PI3K participa en la respuesta del EGF, pero no parece contribuir significativamente en la acción del PDGF, mientras que la PKC juega un papel importante en la acción de ambos factores de crecimiento.

Los resultados aportan información acerca de diferentes interacciones moduladoras que ocurren a nivel del receptor α_{1B} -adrenérgico, que puede ayudar a explicar la manera en que la célula puede procesar e integrar la información que recibe de agonistas que activan múltiples vías de transducción de la señal.

que promueven el recambio de fosfoinosítidos y la formación de DAG, incrementa la actividad de la enzima por un mecanismo dependiente de PKC. Mediante la cotransfección de PKD con diferentes mutantes constitutivamente activas de diferentes isoformas de PKC se ha demostrado que la PKD es estimulada específicamente por isoenzimas de PKC nuevas (PKC ϵ y PKC η). En células Swiss 3T3 el tratamiento con PDGF aumenta la actividad de la PDK mediante la estimulación de la PLC γ , formación de DAG y activación de la PKC (Zugaza y col., 1996, 1997; Van Lint y col., 1998).

Esta información permite sugerir la posible participación de la PKD en la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por el PDGF, lo que sería interesante confirmar en un estudio posterior (Fig. 6).

Los resultados indican que el EGF y el PDGF activan vías diferentes para la regulación del receptor α_{1B} -adrenérgico en las células Rat-1. Se han descrito diferencias en la estimulación de otras vías de transducción de la señal por estos factores de crecimiento. Por ejemplo, en los fibroblastos Rat-1 y otros tipos celulares, el PDGF activa a la fosfolipasa D (PLD) y a la fosfolipasa específica para fosfatidilcolina (PLC-C), pero el EGF no modifica la actividad de la PLC-C y sólo estimula ligeramente a la PLD. Un dato importante es que la activación de la PLC γ inducida por PDGF es mucho mayor que la producida por el EGF, lo que apoya el punto de vista de la participación de esta enzima en la acción moduladora del PDGF sobre el receptor α_{1B} -adrenérgico (Yeo y col., 1994; Yeo y Exton, 1995; Zugaza y col., 1996; Hess y col., 1997; van Dijk y col., 1997).

Los estudios funcionales muestran que **la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por el EGF y PDGF se correlaciona con su desensibilización.** El tratamiento con EGF y PDGF redujo significativa el nivel de acoplamiento del receptor con la proteína G $_{q/11}$ inducido por la NE.

En **conclusión**, los resultados de este estudio indican que en fibroblastos Rat-1 los receptores α_{1B} -adrenérgicos son fosforilados significativamente como consecuencia de la activación de los receptores ET $_{1A}$ de endotelina y en menor grado por la estimulación de los receptores B $_2$ de bradicinina. La acción de los receptores ET $_{1A}$ es mediada por la activación secuencial de cinasas de tirosina y de la PKC, que cataliza la fosforilación principalmente de residuos de serina del receptor. La modificación del receptor inducida por los receptores ET $_{1A}$, pero no por los B $_2$ de bradicinina, promueve su desensibilización. Un incremento importante en el nivel de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, que se correlaciona con la disminución en su actividad, también se presenta en respuesta a la estimulación de receptores con actividad de cinasa de tirosina, como los de EGF y PDGF. Diferentes mecanismos intervienen en los efectos moduladores de estos factores de crecimiento; la PI3K participa en la respuesta del EGF, pero no parece contribuir significativamente en la acción del PDGF, mientras que la PKC juega un papel importante en la acción de ambos factores de crecimiento.

Los resultados aportan información acerca de diferentes interacciones moduladoras que ocurren a nivel del receptor α_{1B} -adrenérgico, que puede ayudar a explicar la manera en que la célula puede procesar e integrar la información que recibe de agonistas que activan múltiples vías de transducción de la señal.

BIBLIOGRAFIA

- Alblas, J., van Etten, I., Khanum, A., Moolenaar, W.H. (1995) C-terminal truncation of the neurokinin-2 receptor causes enhanced and sustained agonist-induced signaling. *J. Biol. Chem.* **270**: 8944-8951
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A., and Bownes, M. (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* **7**: 776-789
- Barak, L.S., Tiberi, M., Freedman, N.J., Kwatra, M.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1994) A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated β_2 -adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* **269**: 2790-2795
- Barak, L.S., Ferguson, S.S.G., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T., Caron, M.G. (1997) Internal trafficking and surface mobility of a functional intact β_2 -adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol. Pharmacol.* **51**: 177-184
- Barker, S., Kapas, S., Fluck, R.J., Clark, A.J. (1995) Effects of the selective protein kinase C inhibitor Ro 31-7549 on human angiotensin II receptor desensitization and intracellular calcium release. *FEBS Lett* **369**: 263-266
- Beaumont, V., Hepworth, M.B., Luty, J. S., Kelly, E., Henderson, G. (1998) Somatostatin receptor desensitization in NG108-15 cells. A consequence of receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* **273**: 33174-33183
- Benovic, J.L., Bouvier, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1988) Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**: 405-428
- Benya, R.V., Fathi, Z., Battey, J.F., Jensen, R.T. (1993) Serines and treonines in the gastrin-releasing peptide receptor carboxyl terminus mediated internalization. *J. Biol. Chem.* **268**: 29285-29290
- Benya, R.V., Kusui, T., Battey, J.F., Jensen, R.T. (1995) Chronic desensitization and down-regulation of the gastrin-releasing peptide receptor are mediated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **270**: 3346-3352
- Berry, S.A., Shah, M.C., Khan, N., 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
- Blaukat, A., Alla, S.A., Lohse, M.J., Müller-Esterl, W. (1996) Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **271**: 32366-32374

- Blaukat, A., Ivankovic-Dikic, I., Grönroos, E., Dolfi, F., Tokiwa, G., Vuori, K., Dikic, I. (1999) Adaptor protein GRB2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **274**: 14893-14901
- Bogatekewitsch, G.S., Lenz, W., Jakobs, K.H., Koppen, J.V. (1996) Receptor internalization delays m4 muscarinic acetylcholine receptor resensitization at the plasma membrane. *Mol. Pharmacol.* **50**: 424-429
- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L.M., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. II. Effects of agonist occupancy on phosphorylation of alpha 1- and beta 2- adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **262**: 3106-3113
- Bouvier, M., Collins, S., O'Dowd, B.F., Campbell, P.T., deBlasi, A., Kobilka, B.K., McGregor, C., Irons, G.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1989) Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J. Biol. Chem.* **264**: 16786-16792
- Bouvier, M., Guilbault, N., Bonin, H. (1991) Phorbol-ester-induced phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor decreases its coupling to Gs. *FEBS Lett.* **279**: 243-248
- Cazaubon, S., Chaverot, N., Romero, I.A., Girault, J.A., Adamson, P., Strosberg, A.D., Couraud, P.O. (1997) Growth factor activity of endothelin-1 in primary astrocytes mediated by adhesion-dependent and -independent pathways. *J. Neurosci.* **17**: 6203-6212
- Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**: 14843-14846
- Corvera, S., García-Sáinz, J.A. (1984) Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic regulation of hepatocyte metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**: 1128-1133
- Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M., García-Sáinz, J.A. (1986) Phorbol esters inhibit alpha 1-adrenergic effects and decrease the affinity of liver cell alpha 1-adrenergic receptors for (-)-epinephrine. *J. Biol. Chem.* **261**: 520-526
- Cotecchia, S., Leeb-Lundberg, L.M.F., Hagen, P.O., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1985) Phorbol ester effects on α_1 -adrenergic receptor binding and phosphatidyl inositol metabolism in cultured vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* **37**: 2389-2398.
- Cowlen, M.S., Towes, M.L. (1988) Evidence for α_1 -adrenergic receptor internalization in DDT1 MF-2 cells following exposure to agonists plus protein kinase C activators. *Mol. Pharmacol.* **34**: 340-346
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., Gutkind, J.S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* **369**: 418-420
- Csukai, M., Chen, C.H., De Matteis, M.A., Mochly-Rosen, D. (1997) The coatomer protein β' -COP, a selective binding protein (RACK) for protein Kinase C ϵ . *J. Biol. Chem.* **272**: 29200-29206

- Chabry, J., Botto, J.M., Nouel, D., Beaudet, A., Vincent, J.P., Mazella, J. (1995) Thr-422 and Tyr-424 residues in the carboxyl terminus are critical for the internalization of the rat neurotensin receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 2439-2442
- Chen, Y.-H., Pouyssegur, J., Courtneidge, S.A., Van Obberghen-Schilling, E. (1994) Activation of Src family kinase activity by the G protein-coupled trombine receptor in growth responsive fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**: 27372-27377
- Chen, C.-C., Chang, J., Chen, W.-C. (1995) Role of protein kinase C subtypes α and δ in the regulation of bradykinin-stimulated phosphoinositide breakdown in astrocytes. *Mol. Pharmacol.* **39**: 39-47
- Chow, M.M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L.K., Lee, M.H., Chen, C.-S., Newton, A. C., Schaffhausen, B.S., Toker, A. (1998) Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* **8**: 1069-1077
- Chuang, T.T., LeVine III, H., De Blasi, A. (1995) Phosphorylation and activation of β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **270**: 18660-18665
- Chun, M., Liyanage, U.K., Lisanti, M.P., Lodish, H.F. (1994) Signal transduction of a G protein coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 11728-11732
- Damke, H. (1996) Dynamin and receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett.* **389**: 48-51
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**: 557-560
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., Ullrich, A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* **16**: 7032-7044
- Daviet, L., Lehtonen, J.Y.A., Tamura, K., Griese, D.P., Horiuchi, M., Dzau, V.J. (1999) Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J. Biol. Chem.* **274**: 17058-17062.
- de Weerd, W.F.C., Leeb-Lundberg, L.M.F (1997) Bradykinin sequesters B_2 bradykinin receptors and the receptor-coupled G_{α} subunits $G_{\alpha q}$ and G_i in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 17858-17866
- Dell'Acqua, M.L., Scott, J.D. (1997) Protein kinase A anchoring. *J. Biol. Chem.* **272**: 12881-12884
- Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D. K., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R.J. (1997) Ras-dependent Mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of G_i - and G_q -mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J. Biol. Chem.* **272**: 19125-19132

- Denning, M.F., Dlugosz, A.A., Threadgill, D.W., Magnuson, T., Yuspa, S.H. (1996) Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C δ . *J. Biol. Chem.* **271**: 5325-5331
- Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K., Lohse, M.J. (1999) Phosphorylation independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5476-5481
- Dickic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A., Schlessinger, J. (1996) A role of Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* **383**: 547-550
- Diviani, D., Lattion, A.L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic J.L., Cottechia, 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
- Diviani, D., Lattion, A.L., Cottechia, 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
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 653-688
- Eason, M.G., Moreira, S.P., Liggett, S.B. (1995) Four consecutive serines in the third intracellular loop are the sites for β -adrenergic receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization of the α_{2A} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 4681-4788
- Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E.D., Kawakatsu, H., Owada, K.M., Hirata, Y., Marumo, F., Inagami T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 8890-8896
- El Kouhen, R., Kouhen, O.M.-E., Law, P.-Y., Loh, H.H. (1999) The absence of a direct correlation between the loss of [D-Ala²,MePhe⁴,Gly⁵-ol]enkephalin inhibition of adenylyl cyclase activity and agonist-induced μ -opioid receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**: 9207-9215
- Faure, M., Voyno Y.T., Bourne, H.R. (1994) cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in Cos-7 cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 7851-7854
- Feng, X., Zhang, J., Barak, L.S., Meyer, T., Caron, M.G., Hannun, Y.A. (1998) Visualization of dynamic trafficking of a protein kinase C β II/green fluorescent protein conjugate reveals differences in G protein-coupled receptor activation and desensitization. *J. Biol. Chem.* **273**: 10755-10762

- Ferguson, S.S.G., Ménard, L., Barak, L., Koch, W.J., Colaprieto, A.-M., Caron, M.G. (1995) Role of phosphorylation in agonist-promoted β_2 -adrenergic receptor sequestration: rescue of a sequestration-defective mutant receptor by β ARK1. *J. Biol. Chem.* **270**: 24782-24789
- Ferguson, S.S.G., Downey, W.E., Colaprieto, A.-M., Barak, L., Ménard, L., Caron, M.G. (1996) Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**: 363-366
- Fonseca, M.I., Button, D.C., Brown, R.D. (1995) Agonist regulation of α_{1B} -adrenergic receptor subcellular distribution and function. *J. Biol. Chem.* **270**: 8902-8909
- Freedman, N.J., Liggett, S.B., Drachman, D.E., Pei, G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1995) Phosphorylation and desensitization of the human β_1 -adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinase and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 17953-17961
- Freedman, N.J., Ament, A.S., Oppermann, M., Stoffel, R.H., Exum, S.T., Lefkowitz, R.J. (1997) Phosphorylation and Desensitization of Human Endothelin A and B Receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J. Biol. Chem.* **272**: 17734-17743
- Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J. (1996) Identification of the G-protein coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **271**: 13796-13803
- Fukushima, Y., Asano, T., Takata, K., Funaki, M., Ogihara, T., Anai, M., Tsukuda, K., Saitoh, T., Katagiri, H., Aihara, M., Matsushashi, N., Oka, Y., Sugano, K. (1997) Role of the C terminus in histamine H2 receptor signaling, desensitization, and agonist-induced internalization. *J. Biol. Chem.* **272**: 19464-19470
- Fujimoto, K., Ohta, K., Kangawa, K., Kikkawa, U., Ogino, S., Fukui, H. (1999) Identification of protein kinase C phosphorylation sites involved in phorbol ester-induced desensitization of the histamine H₁ receptor. *Mol. Pharmacol.* **55**: 735-742
- Gabilondo, A.M., Krasel, C., Lohse, M.J. (1996) Mutations of Tyr³²⁶ in the β_2 -adrenoceptor disrupt multiple receptor functions. *Eur. J. Pharmacol.* **307**: 243-250
- Galisteo, M.L., Dikic, I., Batzer, A.G., Langdon, W.Y., Schlessinger, J. (1995) Tyrosine phosphorylation of the *c-cbl* proto-oncogene protein product and association with epidermal growth factor (EGF) receptor upon EGF stimulation. *J. Biol. Chem.* **270**: 20242-20245
- García-Sáinz, J.A., Macías-Silva, M. (1995) Species heterogeneity of liver α_1 -adrenoceptors: Subtypes, signal transduction and regulation. *Pharmacol. Commun.* **6**: 53-60
- García-Sáinz, J.A., Alcántara-Hernández, R. (1998) Hormonal modulation of protein kinase C isoforms in Rat-1 fibroblasts expressing α_{1B} -adrenoceptors. *Pharmacol. Rev. Commun.* **10**: 119-124

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Garland, A.M., Grady, E.F., Lovett, M., Vigna, S.R., Frucht, M.M., Krause, J.E., Bunnett, N.W. (1996) Mechanisms of desensitization and resensitization of G protein-coupled neurokinin1 and neurokinin2 receptors. *Mol. Pharmacol.* **49**: 438-446
- Gilman, A.G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 615-649
- Goodman, O.G. Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., Benovic, J.L. (1996) β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. *Nature* **383**: 447-450
- Goodnight, J.A., Mischak, H., Kolch, W., Mushinski, J.F. (1995) Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J. Biol. Chem.* **270**: 9991-10001
- Gurevich, V.V., Dion, S.B., Onorato, J.J., Ptasienski, J., Kim, C.M., Sterne-Marr, R., Hosey, M.M., Benovic, J.L. (1995) Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, β_2 -adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J. Biol. Chem.* **270**: 720-731
- Gutkind, J.S. (1998) The pathway connecting G-protein-coupled receptors to nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **273**: 1839-1842
- Hadcock, J.R., Malbon, C.C. (1988) Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5021-5025
- Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K., Uchiyama, H. (1996) Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**: 2776-2782
- Hausdorff, W.P., Bouvier, M., O'Dowd, B.F., Irons, G.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **264**: 12657-12665
- Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990) Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor. *FASEB J.* **4**: 2881-2889
- Hausdorff, W.P., Campbell, P.T., Ostrowski, J., Yu, S.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991) Small region of the β -adrenergic receptor is selectively involved in its rapid regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2979-2983
- Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1995) Distinct Pathways of G_i - and G_q -mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **270**: 17148-17153
- Hawes, B.E., Luttrell, L.M., van Biesen, T., Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediated in the $G\beta\gamma$ -mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 12133-12136

- Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G., Gudermann, T. (1998) Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8985-8990
- Hess, J.A., Ross, A.H., Qiu, R.G., Symons, M., Exton, J.H. (1997) Role of Rho family proteins in phospholipase D activation by growth factors. *J. Biol. Chem.* **272**:1615-1620
- Higaki, M., Sakaue, H., Ogawa, W., Kasuga, M., Shimokado, K. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase-independent signal transduction pathway for platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **271**: 29342-29346
- Hoche, B., Merker, H.-J., Dürr, J.A., Schiller, S., Gross, P., Hensen, J. (1992) Internalization of V₂-vasopressin receptors in LLC-PK₁-cells: Evidence for receptor mediated endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **186**: 1376-1383
- Hofmann, J. (1997) The potential for enzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* **11**: 649-669
- Hordijk, P.L., Verlaan, I., van Corven, E.J., Moolenaar, W.H. (1994) Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by the G_i-p21ras pathway. *J. Biol. Chem.* **269**: 645-651
- Hu, Z.W., Shi, X.Y., Lin, R.Z., Hoffman, B.B. (1996) Alpha1 adrenergic receptors activate phosphatidylinositol 3-kinase in human vascular smooth muscle cells. Role in mitogenesis. *J. Biol. Chem.* **271**: 8977-8982
- Hu, Z.W., Shi, X.Y., Lin, R.Z., Hoffman, B.B. (1999) Contrasting signalling pathways of α_{1A} α_{1B} -adrenergic receptor subtype activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras in transfected NIH 3T3 cells. *Mol. Endocr.* **13**: 3-14
- Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J., Chen, C.H., Mochly-Rosen, D., Messing, R.O. (1997) An inhibitory fragment derived from protein kinase C ϵ prevents enhancement of nerve growth factor responses by ethanol and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **272**: 15028-15035
- Inglese, J., Freedman, N.J., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. (1993) Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **268**: 23735-23738
- Ip, Y.T, Davis R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 205-219
- Ishii, K., Chen, J., Ishii, M., Koch, W.J., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J., Coughlin, S.R. (1994) Inhibition of thrombin receptor signalling by a G-protein coupled receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **269**: 1125-1130
- Ito, A., Satoh, T., Kaziro, Y., Ito, H. (1995) G protein $\beta\gamma$ subunit activates Ras, Raf and MAP kinase in HEK 293 cells. *FEBS Lett.* **368**: 183-187

- Jewell-Motz, E.A., Liggett, S.B. (1996) G protein-coupled receptor kinase specificity for phosphorylation and desensitization of α_2 -adrenergic receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* **271**: 18082-18087
- Ji, Q.-S., Winnier, G.E., Niswender, K.D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M.A., Carpenter, G. (1997) Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in mammalian growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2999-3003
- Johnson, J.A., Clark, R.B., Friedman, J., Dixon, R.A.F., Strader, C.D. (1990) Identification of a specific domain in the beta-adrenergic receptor required for phorbol ester-induced inhibition of catecholamine-stimulated adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* **38**: 289-293
- Karoor, V., Shih, M., Tholanikunnel, B., Malbon, C.C. (1996) Regulating expression and function of G-protein-linked receptors. *Prog. Neurobiology* **48**: 555-568
- Kennelly, P.J., Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**: 15555-15558
- Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L. F., Lefkowitz, R.J. (1994) Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12706-12710
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., Rapp, U.R. (1993) protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**: 249-252
- Koenig, J.A., Edwardson, J.M. (1997) Endocytosis and recycling of G protein coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**: 276-287
- Kong, G., Penn, R., Benovic, J.L. (1994) A β -adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 13084-13087
- Kovačič, B., Ilić, D., Damsky, C.H., Gardner, D.G. (1998) c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* **273**: 35185-35193
- Krueger, K.M., Daaka, Y., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J. (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of β_2 -adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.* **272**: 5-8
- Krupnick, J.G., Goodman, O.B., Keen, J.H., Benovic, J.L. (1997) Arrestin/Clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **272**: 15011-15016
- Krupnick, J.G., Benovic, J.L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 289-319
- Kurose, H., Lefkowitz, R.J. (1994) Differential desensitization and phosphorylation of three cloned and transfected α_2 -adrenergic receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* **269**: 10093-10099

- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* **271**: 24313-24316
- Lamm, M.L.G, Hunzicker-Dunn, M. (1994) Phosphorylation-independent desensitization of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in porcine follicular membranes. *Mol. Endocrinol.* **8**: 1537-1546
- Lattion, A.-L., Diviani, D., 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
- Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P., Parker, P.J. (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**: 2042-2045
- Leeb-Lundberg, L.M.F., Cotecchia, S., Lomasney, J.W., DeBernardis, J.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1985) Phorbol esters promote α_1 -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5651-5655
- Leeb-Lundberg, L.M.F., Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist promoted desensitization and phosphorylation of α_1 -adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 3098-3105
- Lefkowitz, R.J., Hausdorff, W.P., Caron, M.G. (1990) Role of phosphorylation in desensitization of the β -adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**: 190-194
- Lembo, P.M.C., Albert, P.R. (1995) Multiple phosphorylation sites are required for pathway-selective uncoupling of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor by protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **48**: 1024-1029
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B., Schlessinger, J.A. (1995) Protein Tyrosine kinase Pyk2 involved Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* **376**: 737-745
- Levesque, L., Dean, N.M., Sasmor, H., Crooke, S.T. (1997) Antisense oligonucleotides targeting human protein kinase C- α inhibit phorbol ester-induced reduction of bradykinin-evoked calcium mobilization in A549 cells. *Mol. Pharmacol.* **51**: 209-216
- Li, W., Mischak, H., Yu, J.C., Wang, L.M., Mushinski, J.F., Heidaran, M.A., Pierce, J.H. (1994) Tyrosine phosphorylation of protein kinase C-delta in response to its activation. *J. Biol. Chem.* **269**: 2349-2352
- Li, X., Lee, J.W., Graves, L.M., Earp, H.S. (1998) Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppress a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J.* **17**: 2574-2583

- Lin, F.-T., Krueger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J. (1997) Clathrin-mediated endocytosis of the β -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of β -arrestin1. *J. Biol. Chem.* **272**: 31051-31057
- Linseman, D.A., Benjamin, C.W., Jones, D.A. (1995) Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 12563-12568
- Lohse, M.J., Benovic, J., Caron, M., Lefkowitz, R.J. (1990) Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **265**: 3202-3209
- Lohse, M.J. (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochem. Biophys. Acta* **1179**:171-88
- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellicci, P.G., Gutkind, J.S., Wetzker, R. (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signalling pathway through PI 3-kinase. *Science* **275**: 394-397
- Luttrell, L.M., Hawes, B.E., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lansing, T.J., Lefkowitz, R.J. (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G-protein coupled receptor- and G $\beta\gamma$ subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 19443-19450
- Luttrell, L.M., Della Rocca, J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lefkowitz, R.J. (1997) G subunits mediate src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J. Biol. Chem.* **272**: 4637-4644
- Malbon, C.C., Karoor, V. (1998) G-protein linked receptors as tyrosine kinase substrates: New paradigms in signal transduction. *Cell. Signal.* **10**: 523-527
- Ménard, L., Ferguson, S.S.G., Barak, S.L., Bertrand, L., Premont, R.T., Colaprieto, A.-M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1996) Members of the G protein-coupled receptor kinase family that phosphorylate the β_2 -adrenergic receptor facilitate sequestration. *Biochemistry* **35**: 4155-4160
- Ménard, L., Ferguson, S.S.G., Zhang, J., Lin, F.-T., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Barak, S.L. (1997) Synergistic regulation of β_2 -adrenergic receptor sequestration: Intracellular complement of β -adrenergic receptor kinase and β -arrestin determine kinetics of internalization. *Mol. Pharmacol.* **51**: 800-808
- Minneman, K.P. (1988) α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. *Pharmacol. Rev.* **40**: 87-119
- Mochly-Rosen, D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: A theme in signal transduction. *Science* **268**: 247-251
- Moro, O., Lamah, J., Sadee, W. (1993) Serine- and threonine-rich domains regulates internalization of muscarinic cholinergic receptors. *J. Biol. Chem.* **268**: 6862-6865

Moro, O., Shockley, N.S., Lameh, J., Sadee, W. (1994) Overlapping multi-site domains of muscarinic cholinergic m1 receptor involved in signal transduction and sequestration. *J. Biol. Chem.* **269**: 6651-6655

Mukherjee, S., Palczewski, K., Gurevich, V., Benovic, J.L., Banga, J.P., Hunzicker-Dunn, M. (1999) A direct role for arrestins in desensitization of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in porcine ovarian follicular membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 493-498

Nagayama, Y., Tanaka, K., Hara, T., Namba, H., Yamashita, K., Niwa, M. (1996) Involvement of G protein-coupled receptor kinase 5 in homologous desensitization of the thyrotropin receptor. *J. Biol. Chem.* **271**: 10143-10148

Nakanishi, H., Brewer, K.A., Exton, J.H. (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **268**: 13-16

Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**: 249-257

Nussenzveig, D.R., Heinfink, M., Gershengorn, M.C. (1993) Agonist-stimulated internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor is dependent on two domains in the receptor carboxyl-terminus. *J. Biol. Chem.* **268**: 2389-2392

Ohguro, H., Rudnicka-Nawrot, M., Buczylo, J., Zhao, X., Taylor, J.A., Walsh, K.A., Palczewski, K. (1996) Structural and enzymatic aspects of rhodopsin phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **271**: 5215-5224

Opperman, M., Freedman, N.J., Alexander, R.W., Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**: 13266-13272

Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**: 573-580

Pei, G., Kieffer, B.L., Lefkowitz, R.J., Freedman, N.J. (1995) Agonist-dependent phosphorylation of mouse delta opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **48**: 173-177

Pfeilschifter, J., Fandrey, J., Ochsner, M., Whitebread, S., de Gasparo, M. (1990) Potentiation of angiotensin II-stimulated phosphoinositide hydrolysis, calcium mobilization and contraction of renal mesangial cells upon down-regulation of protein kinase C. *FEBS Lett.* **261**: 307-311

Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Lohse, M.J. (1993) Overexpression of β -arrestin and β -adrenergic receptor kinase augment desensitization of β_2 -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **268**: 3201-3208

Pippig, S., Andexinger, S., Lohse, M.J. (1995) Sequestration and recycling of β_2 -adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.* **47**: 666-676

- Pitcher, J., Payne, E.S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A.A., Lefkowitz, R.J. (1995) The G protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 8343-8347
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 653-692
- Post, S.R., Aguila-Buhain, O., Insel, P.A. (1996) A key role for protein kinase A in homologous desensitization of the β_2 -adrenergic receptor pathway in S49 lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 895-900
- Prado, G.N., Taylor, L., Polgar, P. (1997) Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B₂ receptor. *J. Biol. Chem.* **272**: 14638-14642
- Prado, G.N., Mierke, D.F., Pellegrini, M., Taylor, L., Polgar, P. (1998) Motif mutation of bradykinin B₂ receptor second intracellular loop and proximal C terminus is critical for signal transduction, internalization and resensitization. *J. Biol. Chem.* **273**: 33548-33555
- Premont, R.T., Inglese, J., Lefkowitz, R.J. (1995) Protein kinases that phosphorylated activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**: 175-182
- Rameh, L.E., Cantley, L.C. (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* **274**: 8347-8350
- Rao, R.V., Roettger, B.F., Hadac, E.M., Miller, L.J. (1997) Roles of cholecystokinin receptor phosphorylation in agonist-stimulated desensitization of pancreatic acinar cells and receptor-bearing chinese hamster ovary cholecystokinin receptor cells. *Mol. Pharmacol.* **51**: 185-192
- Rebecchi, M.J., Scarlata, S. (1998) Pleckstrin homology domains: A common fold with diverse functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**: 503-528
- Rhee, S.G., Bae, Y.S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**: 15045-15048
- Roberts, R. A., and Gullick, W. J. (1989) Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis are increased by expression of a mutant ras oncogene. *J. Cell Sci.* **94**: 527-535
- Rodríguez-Fernández, J.L., Rozengurt, E. (1996) Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. Dissociation from tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 27895-27901
- Roettger, B.F., Rentsch, R.U., Pinon, D., Holicky, E., Hadac, E., Larkin, J.M., Miller, L.J. (1995a) Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell. Biol.* **128**: 1029-1042

- Roettger, B.F., Rentsch, R.U., Hadac, E.M., Hellen, E.H., Burghardt, T.P., Miller, L.J. (1995b) Insulation of a G protein-coupled receptor on the plasmalemmal surface of the pancreatic acinar cell. *J. Cell. Biol.* **130**: 579-590
- Ron, D., Chen, C.-H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., Mochly-Rosen, D. (1994) Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the β subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 839-843
- Ron, D., Luo, J., Mochly-Rosen, D. (1995) C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of β protein kinase C *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**: 24180-24187
- Rosen, L.B., Greenberg, M.E. (1996) Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1113-1118
- Sabri, A., Govindarajan, G., Griffin, T.M., Byron, K.L., Samarel, A.M., Lucchesi, P.A. (1998) Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK2 by angiotensin II in vascular smooth muscle. *Circ. Res.* **83**: 841-851
- Sadoshima, J., Izumo, S. (1996) The heterotrimeric G_q protein-coupled angiotensin II receptor activates p21^{ras} via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J.* **15**: 775-787
- Salazar, E.P., Rozengurt, E. (1999) Bombesin and platelet-derived growth factor induce association of endogenous focal adhesion kinase with Src in intact Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 28371-28378.
- Schlador, M.L., Nathanson, N.M. (1997) Synergistic regulation of m2 muscarinic acetylcholine receptor desensitization and sequestration by G protein-coupled kinase-2 and beta arrestin-1. *J. Biol. Chem.* **272**: 18882-18890
- Scherer, N.M., Nathanson, N.M. (1990) Differential regulation by agonist and phorbol of cloned m1 and m2 muscarinic acetylcholine receptors in mouse Y1 adrenal cells and Y1 cells deficient in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **29**:8475-8483
- Schlessinger, J., Ulrich, A. (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**: 383-391
- Schönwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J., Parker, P.J. (1998) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 790-798
- Schwinn, D.A., Page, S.O., Middleton, J.P., Lorenz, W., Liggett, S.B., Yamamoto, K., Lapetina, E.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S. (1991) The alpha_{1C}-adrenergic receptor: characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity. *Mol. Pharmacol.* **40**: 619-626

- Shih, M., Malbon, C.C. (1994) Oligodeoxynucleotides antisense to mRNA encoding protein kinase A, protein kinase C, and β -adrenergic receptor kinase reveals distinctive cell-type-specific roles in agonist-induced desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12193-12197
- Shih, M., Malbon, C.C. (1996) Protein Kinase C deficiency blocks recovery from agonist-induced desensitization. *J. Biol. Chem.* **271**: 21478-21483.
- Sibley, D.R., Strasser, R.H., Benovic, J.L., Daniel, K., Lefkowitz, R.J. (1986) Phosphorylation/dephosphorylation of the β -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9408-9412
- Simonson, M.S., Wang, Y., Herman, W.H. (1996) Nuclear signaling by endothelin-1 requires Src protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 77-82
- Slice, L.W., Wong, H.C., Sternini, C., Grady, E.F., Bunnett, N.W., Walsh, J.H. (1994) The conserved NPX_nY motif present in the gastrin-releasing peptide receptor is not a general sequestration sequence. *J. Biol. Chem.* **269**: 21755-21762
- Smit, M.J., Bloemers, S.M., Leurs, B.R., Tertoolen, L.G.J., Bast, A., de Laat, S.W., Timmerman, H. (1992) Short-term desensitization of the histamine H1 receptor in human HeLa cells: involvement of protein kinase C dependent and independent pathways. *Br. J. Pharmacol.* **107**: 448-455
- Smith, R.D., Hunyady, L., Olivares-Reyes, J.A., Mihalik, B., Jayadev, S., Catt, K.J. (1998) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT_{1A} receptor is localized to a serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol. Pharmacol.* **54**: 935-941
- Soltoff, S.P., Toker, A. (1995) Carbachol, substance P, and phorbol ester promote the tyrosine phosphorylation of protein kinase C in salivary gland epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 13490-13495
- Spurney, R.F. (1999) Role of C-terminal serines in desensitization of the mouse thromboxane receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 28496-28503
- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., Hawkins, P.T. (1997) The G β y sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**: 105-114
- Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T. (1998) Protein kinase B that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**: 710-714
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, Y., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide 3-kinase. *Science* **269**: 690-693

Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 101-132

Summers, R.J., McMartin, L.R. (1993) Adrenoceptors and their second messenger systems. *J. Neurochem.* **60**: 10-23

Thomas, W.G., Barker, K.M., Motel, T.J., Thekkumkara, T.J. (1995) Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **270**: 22153-22159

Thomas, J.W., Ellis, B., Boerner, R.J., Wilson B., Knight, W.B., White, G.C., Schaller, M.D. (1998) SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J. Biol. Chem.* **273**: 577-583

Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M., Cantley, L.C. (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5-P₃. *J. Biol. Chem.* **269**: 32358-32367

Touhara, K., Hawes, B.E., van Biesen, T., Lefkowitz, R.J. (1995) G protein $\beta\gamma$ subunits stimulate phosphorylation of Shc adapter protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9284-9287

Tsai, W., Moreielli, A.D., Peralta, E.G. (1997) The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *EMBO J.* **16**: 4597-4605

Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H., 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

Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Honma, T., Lameh, J., Sadée, W. (1998) Internalization and down-regulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Role of third intracellular m2 loop and G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **273**: 5323-5330

Valverde, A.M, Sinnott-Smith, J., Van Lint, J., Rozengurt, E. (1994) Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8572-8576

van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Tohuara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1995) Receptor-tyrosine-kinase and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* **376**: 781-784

van Biesen, T., Hawes, B.E., Raymond, J.R., Luttrell, L.M., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. (1996) G_o-protein α -subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein Kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **271**: 1266-1269

van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Medema, R.H., Bos, J.L., Moolenaar, W.H. (1993) Pertussis toxin-sensitive activation of p21^{ras} by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1257-1261

- van Dijk, M.C.M., Muriana, F.J.G., de Widt, J., Hilkmann, H., van Bitterswijk, W.J. (1997) Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in platelet-derived growth factor-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**: 11011-11016
- Van Lint, J., Ni, Y., Valius, M., Merlevede, W., and Vandenheede, J.R. (1998) Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of phospholipase C and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **273**: 7038-7043
- Vázquez-Prado, J., 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
- Vögler, O., Nolte, B., Voss, M., Schmidt, M., Jakobs, K.H., van Koppen, C.J. (1999) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by β -arrestin. *J. Biol. Chem.* **274**: 12333-12338
- von Zastrow, M., Kobilka, B.K. (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human β_2 -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **267**: 3530-3538
- Vouret-Craviari, V., Auberger, P., Pouyssegur, J., Van Obberghen-Schilling, E. (1995) Distinct mechanisms regulate 5HT₂ and trombin receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **270**: 4813-4821
- Wan, Y., Kurosaki, T., Huang, X.-Y. (1996) Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* **380**: 541-544
- Wang, J., Zheng, J., Anderson, J.L., Toews, M.L. (1997) A mutation of the hamster α_{1B} -adrenergic receptor that differentiates two steps in the pathway of receptor internalization. *Mol. Pharmacol.* **52**: 306-313
- Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E., Lohse, M.J. (1996) Protein kinase cross-talk: Membrane targeting of the β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2105-2109
- Wojcikiewicz, R.J.H., Tobin, A.B., Nahorski, S.R. (1993) Desensitization of cell signalling mediated by phosphoinositidase C. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**: 279-285
- Xu, Z., Hirasawa, A., Shinoura, H., Tsujimoto, G. (1999) Interaction of the α_{1B} -adrenergic receptor with gC1q-R, a multifunctional protein. *J. Biol. Chem.* **274**: 21149-21154.
- Yedovitzky, M., Mochly-Rosen, D., Johnson, J.A., Gray, M.O., Ron, D., Abramovitch, E., Cerasi, E., Neshler, R. (1997) Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 1417-1420

- Yeo, E.-J., Kazlauskas, A., Exton, J.H. (1994) Activation of phospholipase C- γ is necessary for stimulation of phospholipase D by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* **269**: 27823-27826
- Yeo, E.-J., Exton, J.H. (1995) Stimulation of phospholipase D by epidermal growth factor requires protein kinase C activation in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 3980-3988
- Yu, S.S., Lefkowitz, R.J., Hausdorff, W.P. (1993) β -adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **268**: 337-341
- Zang, Q., Lu, Z., Curto, M., Barile, N., Shalloway, D., Foster, D.A. (1997) Association between v-Src and protein kinase C δ in v-Src-transformed fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**: 13275-13280
- Zhang, J., Ferguson, S.S.G., Barak, L.S., Ménard, L., Caron, M.G. (1996) Dynamin and β -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **271**: 18302-18305
- Zhang, J., Barak, L.S., Winkler, K.E., Caron, M.G., Ferguson, S.S.G. (1997) A central role for β -arrestin and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in β_2 -adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J. Biol. Chem.* **272**: 27005-27014
- Zhang, Z.H., Johnson, J.A., Chen, L., El-Sherif, N., Mochly-Rosen, D., Boutjdir, M. (1997) C2 region-derived peptides of β -protein kinase C regulate cardiac Ca^{2+} channels. *Circ. Res.* **80**: 720-729
- Zhu, S.-J., Cerutis, D.R., Anderson, J.L., Toews, M.L. (1996) Regulation of hamster α_{1B} -adrenoceptors expressed in chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Pharmacol.* **299**: 205-212
- Zou, Y., Komuro, I., Yamazaki, T., Aikawa, R., Kudoh, S., Shiojima, I., Hiroi, Y., Mizuno, T., Yazaki, Y. (1996) Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **271**: 33592-33597
- Zugaza, J.L., Sinnet-Smith, J., Van Lint, J., Rozengurth, E. (1996) Protein kinase D activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *EMBO J.* **15**: 6220-6230
- Zugaza, J.L., Waldron, R.T., Sinnet-Smith, J., Rozengurt, E. (1997) Bombesin, vasopressin, endothelin, bradykinin, and platelet-derived growth factor rapidly activate protein kinase D through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **272**: 23952-23960
- Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K., Ullrich, A. (1997) Critical role of calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J. Biol. Chem.* **272**: 24767-24770