

03081 14  
.2g



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**Unidad Académica de los Ciclos  
Profesional y de Posgrado del CCH  
Instituto de Fisiología Celular**

**MECANISMO DE ACCION Y PROCESO DE DESEN-  
SIBILIZACION DE LOS SUBTIPOS DE RECEPTORES  
ALFA-1 ADRENERGICOS**

**T E S I S**

**Que para obtener el Grado de**

**DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA  
BASICA**

**P r e s e n t a:**

**M. en C. JOSE VAZQUEZ PRADO**

**México, D.F.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

---

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. J. Adolfo García Sáinz. El proyecto fue apoyado por donativos de la DGAPA y del CONACyT (al Dr. J. Adolfo García Sáinz) y del PADEP (al M. en C. José Vázquez Prado). El autor recibió una beca crédito del CONACyT para realizar estudios de Doctorado.

---

**A Lupita:**

**Porque desde que compartimos  
el camino todo parece más fácil.**

**A mis padres:**

**Miguel y Josefina,  
por todo el cariño que me han dado  
y por todo el orgullo que siento de  
ser hijo de ustedes.**

**A mis hermanos:**

**Miguel, Luis Armando y Alma,  
porque si hubiera tenido la oportunidad  
de escogerlos no hubieran podido ser mejores.**

**A mis abuelitos.**

---

### **Agradecimientos:**

Al Dr. J Adolfo García Sáinz. Por haber depositado su confianza en mí para la realización de este trabajo y por el apoyo constante durante la realización del mismo.

A los Dres. Alejandro Zentella Dehesa y Alejandro García Carrancá. Quienes junto con el Dr. J Adolfo García Sáinz formaron parte de mi comité tutorial. Agradezco su tiempo dedicado a la discusión de los resultados aquí presentados. Sus comentarios y sugerencias fueron enriquecedores durante el desarrollo de este proyecto.

A los Dres. José Bargas, Mauricio Díaz, Alejandro García Carrancá, J Adolfo García Sáinz, Fernando López Casillas, Julio Morán, Marieta Tuena, y Luis Vaca por su revisión crítica del manuscrito, sus sugerencias enriquecieron a mi juicio el contenido y la presentación del mismo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología cuyo apoyo fue fundamental para permitirme realizar estudios de posgrado. Particularmente a la Lic Deborah Haber y a la Dra. Pérez Correa, cuya intervención me permitió contar con apoyo económico por un plazo adicional al que originalmente me había sido concedido. A la M. en C. Guillermina Urbano, quien autorizo que pudiera cambiar de Institución aún cuando ya había transcurrido un año de estudios en otro programa.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por su apoyo durante parte de mis estudios de posgrado.

A los compañeros de los laboratorios 303-Sur y 304-Sur del Instituto de Fisiología Celular: Rocío Alcántara, Gonzalo de Allende, Patricia Casas, Mario Cruz, Agustín García, Claudia González, Diana González, Erick Hernández, Marina Macías, Minerva Martínez, Artemio Mendoza, Luz del Carmen Medina, Alberto Olivares, Martha Robles y Ma. Teresa Romero; por crear una atmósfera agradable para el trabajo, por su ayuda y porque juntos hacemos un gran equipo. En particular a Luz del Carmen Medina, por su colaboración entusiasta e incansable en los experimentos de fosforilación y a Artemio Mendoza por permitirme usar y modificar la figura del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico que con tanta paciencia dibujó.

A las Sras. Guadalupe Jiménez y Guadalupe Franco por su trabajo en el laboratorio que permite facilitar el nuestro.

Al MVZ Héctor Malagón, por su ayuda entusiasta en el manejo de los conejos usados para la obtención de anticuerpos.

---

**"He who swims against the stream  
reaches the source".**

INDICE.	página
i) Resumen.....	4
ii) Abstract.....	5
iii) Glosario.....	6
I. Introducción.....	8
II. Receptores acoplados a proteínas G.....	11
III. Proteínas G.....	13
IV. Receptores para factores de crecimiento.....	17
V. Módulos proteicos.....	17
VI. Coincidencias en las señales transmitidas por receptores acoplados a proteínas G y receptores para factores de crecimiento.....	19
VII. Via de recambio de fosfoinosítidos-calcio.....	20
VIII. Proteína cinasa C.....	22
IX. Desensibilización.....	24
a) Fosforilación de los receptores.....	26
a.1) Cinasas de los receptores acoplados a proteínas G.....	27
a.2) Arrestinas.....	28
a.3) Desensibilización heteróloga por la proteína cinasa A.....	30
a.4) Regulación por la proteína cinasa C.....	31
b) Compartimentalización de los receptores.....	32
c) Disminución del número de receptores.....	33
d) Regulación a nivel de las proteínas G.....	33
e) Regulación por disponibilidad de sustrato.....	34
f) El modelo del receptor $\beta_2$ adrenérgico.....	35
X. Receptores adrenérgicos.....	36
XI. Regulación del receptor $\alpha_{1B}$ adrenérgico.....	40
<b>XII. Objetivos.....</b>	<b>44</b>
<b>XIII. Resultados.....</b>	<b>46</b>
<b>Resumen de resultados.....</b>	<b>46</b>
Primer trabajo:	
"Effect of Phorbol Myristate Acetate on $\alpha_1$ -Adrenergic Action in Cells Expressing Recombinant $\alpha_1$ -Adrenoceptor Subtypes".	
a) Validación del modelo.....	46
b) Transducción de la señal.....	47
c) Desensibilización heteróloga.....	47
d) Desensibilización homóloga.....	47

**Segundo trabajo**

"Endothelin Induces Phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor transfected to Rat-1 Fibroblasts. Comparison with the effect of Norepinephrine".

e) Fotomarcaje e inmunoprecipitación del receptor $\alpha_{1b}$ adrenérgico.....	47
f) Fosforilación del receptor $\alpha_{1b}$ adrenérgico:.....	48
f.1) Efecto de la norepinefrina y de la endotelina.....	48
f.2) Curso temporal.....	48
f.3) Efecto de la genisteína y de la estaurosporina.....	48
f.4) Efecto del tratamiento crónico con ésteres de forbol.....	48
f.5) Efecto de la toxina pertussis.....	48
f.6) Efecto del factor de crecimiento epidérmico.....	49

**Trabajos en extenso:**

1) "Effect of Phorbol Myristate Acetate on $\alpha_1$ -Adrenergic Action in Cells Expressing Recombinant $\alpha_1$ -Adrenoceptor Subtypes".....	50
2) "Endothelin Induces Phosphorylation of $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor transfected to Rat-1 Fibroblasts. Comparison with the effect of Norepinephrine".....	56

**XIV. Discusión.....**

a) Activación de la vía de fosfoinosítidos-calcio por los distintos subtipos de receptores $\alpha_1$ adrenérgicos.....	78
b) Desensibilización homóloga .....	79
c) Coincidencias en la regulación de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos transfectados y los expresados naturalmente en los hepatocitos de distintas especies .....	80
d) Regulación de receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos-calcio.....	80
e) Desensibilización heteróloga.....	82
f) Predicciones a partir de la estructura primaria de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos.....	85
g) Fosforilación del receptor $\alpha_{1b}$ adrenérgico.....	86
h) Perspectivas.....	89

**XV. Conclusiones.....**

**XVI. Referencias.....**



**I) RESUMEN.**

Las catecolaminas son consideradas las hormonas de las grandes emergencias, al estimular a sus receptores activan rápidamente el metabolismo celular y pueden tener acciones a largo plazo tales como inducción en la expresión de ciertos genes y aumento en el tamaño celular. Existen tres familias de receptores adrenérgicos:  $\beta$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  cuya actividad es regulada rápidamente. Los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, motivo de estudio de este trabajo, están acoplados a una proteína Gq y su activación estimula la actividad de la fosfolipasa C que digiere al fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato; el inositol-trisfosfato producido se une a sus receptores en el retículo endoplásmico, incrementando la concentración citosólica de calcio; el diacilglicerol, que permanece insertado en la membrana plasmática, estimula a la proteína cinasa C; generando respuestas múltiples según la célula estimulada, su efecto puede ser reemplazado por ésteres de forbol. Tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos han sido clonados:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$ . Este estudio evaluó la transducción y regulación del estímulo adrenérgico, en clonas independientes de fibroblastos Rat-1 transfectadas con los subtipos mencionados de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ . Se investigó la regulación por la proteína cinasa C (activada con ésteres de forbol) y la desensibilización homóloga. Por último, se determinó la fosforilación del subtipo  $\alpha_{1b}$ , como parte de su mecanismo regulador, en respuesta a norepinefrina, endotelina y activadores directos de la proteína cinasa C, entre otros estímulos celulares.

Cada subtipo activó a la vía de recambio de fosfoinosítidos-calcio con el siguiente orden de potencia:  $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} > \alpha_{1d}$ ; la proteína cinasa C bloqueó totalmente la actividad del subtipo  $\alpha_{1d}$  y parcialmente la del  $\alpha_{1b}$ , no teniendo efecto sobre el  $\alpha_{1a}$ ; la desensibilización homóloga fue similar, aún en células depletadas de la cinasa C por tratamiento prolongado con ésteres de forbol. La fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico aumentó rápidamente, dependiendo de la dosis del agonista, y no cambió al bloquear a la proteína Gi, con la toxina pertussis. En células tratadas crónicamente con ésteres de forbol se detectó un aumento considerable de la fosforilación basal del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, que ya no se incrementó ante la presencia de ninguno de los agentes empleados. La endotelina, a través de receptores ETA, sensibles a BQ-123, tuvo un efecto más rápido e intenso que la norepinefrina, mismo que fue atenuado por inhibición de cinasas de tirosina (con genisteína) y de serina/treonina (con estaurosporina). Consideramos que las particularidades en la regulación de los distintos subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos contribuyen a explicar la razón de su diversidad.

**ii) ABSTRACT.**

The activity of three cloned  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes transfected into Rat-1 fibroblasts, the blockade of their actions by protein kinase C, and the phosphorylation of the subtype  $\alpha_{1b}$ , were studied. Transfected Rat-1 fibroblasts expressing, in different clones, either one of the three cloned  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes were stimulated with norepinephrine, in the presence or absence of phorbol esters, and the production of inositol(1,4,5)triphosphate from  $^3\text{H}$ -myo-inositol labeled cells and the mobilization of intracellular calcium were evaluated. We found the subtype  $\alpha_{1a}$  as the more active, followed by the  $\alpha_{1b}$  and the  $\alpha_{1d}$ . Differential sensitivity between the  $\alpha_1$  adrenergic receptor subtypes to be desensitized in response to the activation of protein kinase C was investigated. The more sensitive was the subtype  $\alpha_{1d}$ , followed by the  $\alpha_{1b}$  and finally, the  $\alpha_{1a}$  was resistant. Since the different adrenergic receptors studied were expressed, at similar levels, in the same cellular background, the differential sensitivity to desensitization mediated by protein kinase C could be attributed to intrinsic characteristics of the receptors, their structural differences could confer them differential susceptibility to phosphorylation by protein kinase C, or to interact with protein kinase C phosphorylated substrates which may interfere with their activity.

Phosphorylation of the adrenoceptor subtype  $\alpha_{1b}$ , as a result of stimulation with norepinephrine or protein kinase C activation, has been considered necessary to regulate receptor desensitization by probably independent mechanisms. In this work, the phosphorylation of this adrenoceptor subtype, induced by norepinephrine, phorbol esters or activation of endogenous endothelin receptors, was demonstrated. The mechanism of endothelin induced phosphorylation of the adrenoceptor  $\alpha_{1b}$  was compared with the effect of norepinephrine. Interestingly, the phosphorylation of this adrenoceptor induced by endothelin, was stronger and faster than the resultant of its homologous activation, suggesting cross-regulation. The pathway activated by endothelin which resulted in phosphorylation of the adrenoceptor  $\alpha_{1b}$  was assessed using inhibitors for serine/threonine and tyrosine kinases. A dose dependent attenuation in the phosphorylation of the

$\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor was detected in cells preincubated with staurosporin or genistein, suggesting that both kind of kinases could be involved, by independent pathways, in the process. No inhibition was observed by preincubation with pertussis toxin. An important increase in the basal phosphorylation of the adrenoceptor was detected in cells chronically treated with phorbol esters, no further increment in phosphorylation of the receptor was observed with any of the experimental manipulations suggesting that in unstimulated cells, protein kinase C could regulate the basal phosphorylation of this receptor in a negative way or that some phorbol ester sensitive isoforms were not completely depleted and instead remained active, maintaining the phosphorylation of the receptor elevated. The differences in the regulatory properties of the  $\alpha_1$ -adrenergic receptors could help to explain their functional diversity.

### III) GLOSARIO DE TERMINOS.

**AMPC.** Adenosin Monofosfato cíclico. Producto de la actividad de la adenilil ciclasa, regula positivamente a la proteína cinasa A.

**CHO.** Línea celular proveniente del ovario del hámster chino.

**GRK.** Cinasa específica para receptores acoplados a proteínas G. Se han clonado 6 subtipos que varían en su secuencia primaria, en su modo de interacción con la membrana plasmática y en sus sustratos. Los subtipos 2 y 3 corresponden a las cinasas del receptor  $\beta$  adrenérgico ( $\beta$ ark-1 y  $\beta$ ark-2), respectivamente.

**IP<sub>3</sub>.** Inositol(1,4,5)trisfosfato. Producto de la actividad de la fosfolipasa C, difunde en el citosol hasta unirse a receptores intracelulares localizados en el retículo endoplásmico. Estos receptores forman un tetrámero que da lugar a un canal de calcio, mismo que se libera del retículo endoplásmico cuando los receptores son activados.

**PH.** Dominio proteico con homología con la proteína plecstrina. Presente en diversas proteínas que participan en transducción. Interviene en interacciones proteína-proteína y proteína-fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato.

**PLC.** Fosfolipasa C. Enzima que digiere al fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato generando diacil-glicerol e inositol-trifosfato. Su actividad conduce a un aumento en la concentración

citosólica de calcio y a la activación de la proteína cinasa C.

**PKA.** Proteína Cinasa A. Heterotetrámero que fosforila residuos de serina y treonina. Consta de dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas. Esta cinasa es activada por AMPc.

**PKC.** Proteína Cinasa C. Familia de cinasas que fosforilan residuos de serina y treonina. Estas enzimas se dividen en tres subgrupos dependiendo de sus requerimientos de cofactores: aquellas reguladas por calcio y diacilglicerol (conocidas como convencionales); las que responden a la presencia exclusivamente del diacilglicerol ( las no convencionales) y las formas atípicas cuyos requerimientos de cofactores aún no están bien establecidos.

**PMA.** Forbol-miristato-acetato. Se le considera un agente promotor de tumores. Activa a la proteína cinasa C.

**Rab.** Proteína G de bajo peso molecular que interviene en la movilización de vesículas intracelulares.

**Ras.** Proteína G de bajo peso molecular involucrada en las vías de transducción que conducen a proliferación celular.

**Rho.** Proteína G de bajo peso molecular que participa en la regulación de la estructura del citoesqueleto de actina.

**SH2.** Dominio proteico, llamado así por su homología con una región de la cinasa Src, se encuentra en diversas proteínas que participan en transducción y su función es interaccionar con fosfotirosinas que se encuentren en un contexto particular.

**SH3.** Dominio proteico presente en diversas proteínas involucradas en transducción, es homólogo a una región de la cinasa Src y se asocia a regiones ricas en prolina que se exponen por un cambio conformacional de la proteína portadora.

**SHC.** Proteína adaptadora que permite la interacción entre proteínas participantes de diversas vías de transducción, particularmente de aquellas activadas por factores de crecimiento.

## I. INTRODUCCION.

Los organismos multicelulares requieren de mecanismos que les permitan la comunicación, adecuada y precisa, entre las células que los constituyen y entre éstas y los diversos estímulos externos a los que constantemente se ven expuestos. La función de la comunicación intercelular se inicia junto con el desarrollo del individuo. En el embrión, las señales transmitidas de una célula a otra regulan el crecimiento, la migración y la diferenciación celular, y su organización en tejidos específicos. En el adulto, el señalamiento celular coordina el comportamiento normal y la respuesta a estímulos externos. Patologías tales como el cáncer, la diabetes y algunos desórdenes de los sistemas nervioso, inmune y cardiovascular, entre otros, pueden tener su origen en alteraciones de los sistemas de señalamiento celular.

Las interacciones celulares siguen una serie de eventos basicamente divididos en dos etapas: inicialmente un mensajero extracelular se une a su receptor específico, ubicado en la célula blanco, transformándolo de un estado pasivo a uno activado; subsecuentemente, el receptor desencadena una serie de eventos bioquímicos intracelulares dando lugar a una respuesta que puede involucrar cambios en la expresión génica, en la arquitectura del citoesqueleto, en el tráfico de proteínas, en la adhesión, en la migración y en el metabolismo celular, entre otros procesos que pueden conducir, incluso, a una respuesta proliferativa.

Las moléculas portadoras de mensajes intercelulares son de naturaleza química muy diversa; existen ejemplos que incluyen proteínas, péptidos pequeños, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos y gases disueltos, tales como el óxido nítrico. Estos agentes alcanzan el espacio extracelular por secreción, o simplemente son liberados por difusión, a través de la membrana plasmática; mientras que algunos permanecen asociados a la superficie celular, desde donde se comunican exclusivamente con las células adyacentes.

En el proceso de comunicación endocrina u hormonal, las glándulas de secreción interna proveen de hormonas al organismo, éstas son liberadas al torrente sanguíneo y la respuesta específica, que se genere ante su presencia, dependerá fundamentalmente de que la "célula blanco" sea capaz de reconocer a la señal en cuestión y de generar las reacciones bioquímicas intracelulares que den lugar a una respuesta metabólica concreta. Independientemente de la naturaleza química de la señal, la influencia de ésta en la célula blanco surge cuando se asocia a los receptores que la capturan con alta especificidad y afinidad; permitiendo que los mensajeros celulares actúen a concentraciones muy pequeñas, generalmente del orden nanomolar. En la mayoría de los casos, los receptores son proteínas integrales de la membrana plasmática; si bien, existen varios mensajeros pequeños y liposolubles que tienen sus receptores localizados en el interior celular (Alberts, *et al*, 1994).

El mecanismo de transducción empleado por los distintos tipos de receptores depende de sus características estructurales, localización y capacidad para interaccionar con diversas proteínas efectoras; por ejemplo, algunos receptores intracelulares, como aquellos que identifican a las hormonas esteroides, pueden localizarse en el núcleo y modular directamente la expresión de genes. Por otro lado, los receptores localizados en la membrana plasmática deben estimular a componentes intracelulares, que transporten y amplifiquen la señal de activación del receptor y que, en muchos casos, sirviéndose de cascadas de fosforilación, pueden llegar a manifestarse a través de la expresión diferencial de los genes (Alberts, *et al*, 1994; García-Sáinz, 1996).

Los receptores de la membrana plasmática se asocian a una gran diversidad de estructuras que les permiten activar a diferentes moléculas efectoras. Así, algunos de ellos controlan el paso de iones, puesto que poseen la estructura de canales (Sivilotti y Colquhoun, 1995); otros, como los receptores para factores de crecimiento, son capaces de fosforilar proteínas en residuos de tirosina (Wilson, 1994; Schlessinger y Ullrich, 1992); en tanto que los receptores para factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  catalizan la

fosforilación de proteínas en residuos de serina o treonina (Massagué, Attisano y Wrana, 1994). Algunos receptores parecen tener actividad de fosfatasa (Charbonneau y Tonks, 1992). Por su parte, muchos ejemplos de receptores que no poseen actividad catalítica se sirven de cinasas citosólicas, como los receptores para interleucinas (Ziemiecki, Harpur y Wilks, 1994); o bien se acoplan a moléculas mediadoras que les permiten controlar la acción de diversos efectores intracelulares; tal es el caso de los receptores acoplados a proteínas G, de los que nos ocuparemos con mayor detalle a continuación.

**Esta tesis está dedicada al estudio de los los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, de los cuales se conocen tres subtipos:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$ , todos ellos capaces de estimular la vía de recambio de fosfoinosítidos, conduciendo a movilización del calcio intracelular y a activación de la proteína cinasa C. El modelo celular que ocupamos en los estudios que se describirán son fibroblastos de la línea Rat-1 transfectados, en clones independientes, con cada uno de los subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, mismos que son expresados de forma estable. Estudios previos en nuestro laboratorio habían demostrado particularidades en la actividad y regulación de estos subtipos adrenérgicos expresados naturalmente en hepatocitos de distintas especies. La ventaja del estudio en un mismo tipo celular permite valorar las diferencias atribuibles a las características intrínsecas de los receptores cuando ellos son expresados en un entorno celular similar. Estudiamos la activación y regulación de los subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, aplicando un estímulo adrenérgico y la activación de la proteína cinasa C. Así mismo, investigamos el efecto de éstos y otros estímulos celulares, sobre la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico; particularmente la activación de los receptores para endotelina que se encuentran expresados naturalmente en las células Rat-1, que son nuestro modelo de estudio, y que nos permite conocer el efecto de la activación de la vía de fosfoinosítidos-calcio a la que éstos se acoplan.**

Es relevante mencionar que como algunas de las acciones de los receptores acoplados a proteínas G coinciden con las que resultan de la estimulación de los

receptores para factores de crecimiento, éstos se describirán más adelante. Así mismo, en una sección especial se hará la descripción de los mecanismos básicos de regulación de los sistemas de transducción, particularmente el de recambio de fosfoinosítidos-calcio. Además se hará una descripción breve de la familia de receptores adrenérgicos, particularmente de los subtipos  $\alpha_1$  y se referirán los detalles, hasta ahora conocidos, en la regulación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico.

## II. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G.

Los receptores acoplados a proteínas G forman parte integral de la membrana plasmática y transmiten señales a través de ella. Una gran variedad de mensajeros intercelulares, entre los que se incluyen neuromoduladores y hormonas, se unen a miembros específicos de esta familia de receptores. La unión del ligando promueve la interacción entre el receptor y una proteína G heterotrimérica, residente en el lado intracelular de la membrana. La activación subsecuente de la proteína G inicia la respuesta, conocida como señal intracelular. Algunas proteínas G regulan la concentración de segundos mensajeros, por ejemplo el adenosin monofosfato cíclico (AMPc) o el calcio. La liberación de éste último, de depósitos intracelulares en donde se encuentra almacenado, es inducida por el inositol trisfosfato, producto de la actividad de

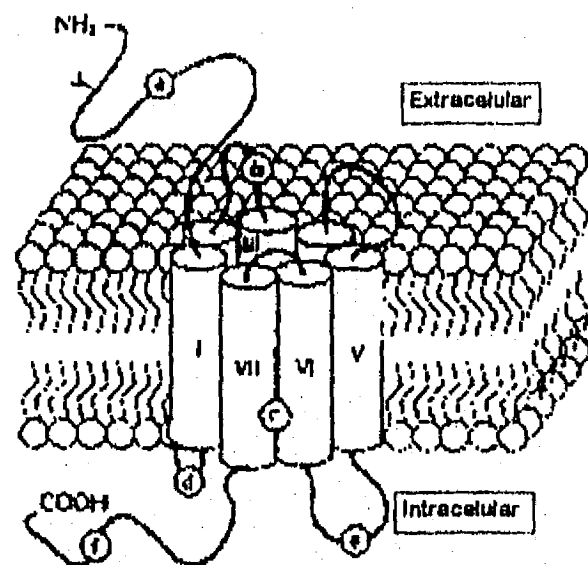


Figura No. 1. Modelo de la estructura de los receptores acoplados a proteínas G. Las letras se refieren a los dominios estructurales. (a) El dominio extracelular, amino-terminal, contiene sitios de glicosilación potencial y permite la unión del ligando en los receptores para hormonas glicoproteicas. (b) Asas extracelulares. (c) Dominios transmembranales, contienen los sitios clave para la unión del ligando algunos receptores. (d) Primera y segunda asas intracelulares, involucradas en el acoplamiento de las proteínas G. (e) Tercera asa intracelular, se cree que determina la especificidad de acoplamiento de las distintas proteínas G, también contiene sitios probables de fosforilación. (f) Dominio carboxilo-terminal, contiene serinas y treoninas que se fosforilan durante el proceso de desensibilización, una de sus cisteínas puede ser palmitoilada, generando una cuarta asa intracelular. Las características mencionadas son generales pero no necesariamente comunes para todos los receptores. Figura modificada de Ilmaa, y Shine, 1992.



una fosfolipasa específica para el fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato que es regulada por una proteína G. Otras proteínas G controlan directamente la función de algunos canales iónicos insertados en la membrana plasmática.

La familia de receptores acoplados a proteínas G comprende más de 300 miembros conocidos a nivel de secuencia primaria. El análisis de ésta revela la presencia de siete segmentos hidrofóbicos, sugiriendo que todos estos receptores comparten la misma estructura tridimensional básica en la región transmembranal (Figura No. 1, Lisima y Shine, 1992). El modelo aceptado para la estructura de estos receptores ubica al extremo amino-terminal hacia el exterior de la célula, en él se encuentran varios sitios que probablemente son modificados por unión de carbohidratos. Los siete dominios hidrofóbicos mencionados estarían formando  $\alpha$  hélices insertadas en la membrana, unidas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares (Baldwin, 1994). En algunos ejemplos, el sitio de interacción del receptor con la proteína G ha sido mapeado, por mutaciones dirigidas, en la tercera asa intracelular, mientras que el dominio carboxilo-terminal, localizado hacia el citosol, parece indispensable para la desensibilización del receptor y contiene secuencias que corresponden a sitios consenso de fosforilación por proteína cinasa C y A, también presentes en la segunda y tercera asas citosólicas. Varios ejemplos de estos receptores, a los que por mutación les ha sido truncado el dominio carboxilo-terminal, son más resistentes a la desensibilización (Lattion, Diviani y Cotecchia, 1994; Alblas, *et al*, 1995) y no sufren internalización eficiente (Thomas *et al*, 1995; Huang, Chen y Nissenson, 1995; Hunyady, *et al*, 1994), luego de la unión de su ligando. Por otra parte, en el dominio carboxilo-terminal se encuentra también un residuo de cisteína que, en algunos casos es el sitio de unión de un palmitato, mismo que al insertarse en la membrana crea una cuarta asa intracelular y modifica, de forma dinámica, la funcionalidad del receptor, gracias a que su unión a la cisteína mencionada no es permanente (Milligan, Parenti y Magee, 1995). Un ejemplo interesante de ello, es la modificación funcional que sufre el receptor  $\beta_2$  adrenérgico al que se le elimina la mencionada cisteína, en este caso, el receptor modificado muestra un incremento importante en su fosforilación basal, que

coincide con una disminución en su actividad, indicando un estado de desensibilización basal (Moffet, *et al*, 1993).

### III. PROTEINAS G.

Las proteínas G pertenecen a la super familia de proteínas con actividad de GTPasa, ésta incluye dos grandes grupos de proteínas que participan en distintas vías de transducción: 1) las proteínas G de bajo peso molecular tales como Ras, que participa activamente en las vías de transducción que llevan a la proliferación celular (Burgering y Bos, 1995); Rho, que regula la arquitectura celular (Nobes y Hall, 1995), modificando activamente a elementos del citoesqueleto de actina ante diversos estímulos extracelulares y Rab, partícipe activo en la movilización intracelular de vesículas (Fisher, *et al*, 1994); además de algunos factores fundamentales para la síntesis proteica y 2) las proteínas G heterotrómicas cuyos componentes son: una subunidad  $\alpha$ , responsable de la unión e hidrólisis del GTP y las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , que funcionalmente actúan siempre juntas (Gilman, 1987).

La familia de las proteínas G heterotriméricas está constituida por una gran diversidad de componentes; todos ellos coordinan la generación de diversas señales intracelulares, como respuesta a la activación de los receptores de siete dominios transmembranales a los que se acoplan diferencialmente. La caracterización de sus componentes indica que hay cuando menos veinte miembros de la subunidad  $\alpha$ , cinco de la subunidad  $\beta$  y doce de la subunidad  $\gamma$ , lo que en potencia podría generar cientos de combinaciones, si la asociación entre ellas fuera aleatoria; sin embargo, la naturaleza ha seleccionado exclusivamente a algunas combinaciones; además de que su distribución tisular y subcelular es variable, introduciendo con ello un primer mecanismo de regulación de las señales que pueden ser transmitidas (Hamm, y Gilchrist, 1996). Por supuesto, otra de las formas importantes de regulación de las proteínas G es su capacidad para interactuar con receptores y sistemas efectores específicos. Por ejemplo, el receptor  $\beta_2$  adrenérgico

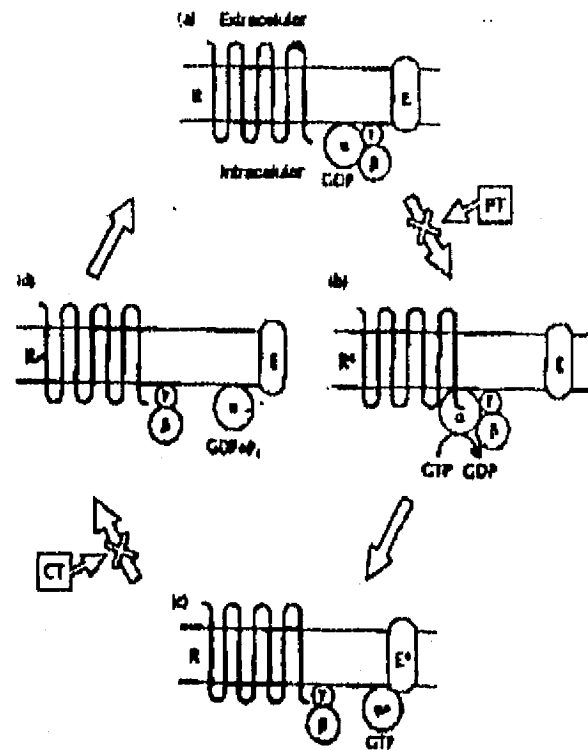


Figura No. 2 Proteínas G y ciclo del GTP. (a) Las subunidades  $\alpha$  en su estado basal contienen GDP y se encuentran unidas con el dímero  $\beta\gamma$ . (b) La interacción con un receptor activado ( $R^*$ ) cataliza el cambio del GDP unido por GTP y la disociación de  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  unida a GTP ( $\alpha^*$ ) se encuentra en su forma activa y regula la actividad del efector (E). Por su parte, el complejo  $\beta\gamma$  también puede regular la actividad de ciertos efectores, además de controlar la translocación de la cinasa GRK2, que fosforila el receptor activado y lo desensibiliza. (c) La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad  $\alpha$  permite la hidrólisis del GTP a GDP, apagando su actividad. De esta forma, se disocia del efector y se reasocia con el dímero  $\beta\gamma$ , para reiniciar el ciclo. Algunas toxinas bacterianas modifican covalentemente a la subunidad  $\alpha$ . La toxina pertussis (PT) lleva al desacoplamiento de la proteína G sobre la que actúa (algún miembro de la familia Gi) de los receptores a los que ésta normalmente se asocia. Esto bloquea la transducción porque impide el cambio de GDP por GTP. La toxina del cólera (CT) actúa sobre la  $G_s$ , reduciendo su actividad intrínseca de GTPasa. Esto causa una duración mayor de la forma activa y por lo tanto una estimulación prolongada del efector. Figura modificada de Spiegel, 1992.

activa a la adenilil ciclasa gracias a que interacciona con la proteína  $G_s$  y sólo una quimera de este receptor, en la que se sustituyen parte de las regiones intracelulares del mismo, por las correspondientes del receptor  $\alpha_{1\beta}$  adrenérgico, es capaz de estimular el recambio de fosfoinosítidos, gracias a que adquiere la propiedad de interaccionar con la proteína  $G_q$  (Cotecchia, et al, 1992). Las proteínas G se encuentran en estado de heterotrímico inactivo cuando la subunidad  $G_\alpha$  lleva unido GDP. La estimulación del receptor de siete dominios transmembranales, que lleva acoplada a una proteína G heterotrimérica, provoca que éste sufra un cambio conformacional que disminuye la afinidad de  $G_\alpha$  por el GDP, resultando en la sustitución de éste por GTP y en la disociación del heterotrímico. En esta forma, tanto la subunidad  $\alpha$  como el dímero  $\beta\gamma$ , asumen su estado activo, mismo que se mantiene hasta que el GTP es hidrolizado y las subunidades vuelven a reasociarse (Figura No. 2). Una herramienta experimental que ha sido de gran utilidad para revelar la participación de

determinadas proteínas G en un evento celular, es el uso de toxinas bacterianas que modifican covalentemente, por ADP-ribosilación, a ciertos miembros de las proteínas G. La toxina derivada del cólera actúa sobre una arginina de la subunidad  $\alpha_s$  (Gierschik y Jakobs, 1990), y estabiliza la forma unida a GTP, ocasionando una activación

permanente de la proteína modificada y manteniendo estimulada a la adenilil ciclasa con el consecuente incremento, constante y pronunciado, en la concentración citosólica del AMPc, además de la activación mantenida de la actividad de la proteína cinasa A, causando un desgaste metabólico de la célula afectada; por otro lado, la toxina obtenida de la *Bordetella pertussis* modifica a la subunidad  $\alpha_i$ , en una cisteína que se encuentra a cuatro aminoácidos de distancia del extremo carboxilo-terminal, e impide su interacción funcional con los receptores a los que normalmente se acopla, bloqueando su activación (Gierschik y Jakobs, 1990).

Las distintas subunidades  $G\alpha$ , cuyo peso molecular oscila entre 39 y 52 kDa y que comparten una homología estructural entre ellas de un 45 y un 80 %, han sido divididas en cuatro clases:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{12}$ , contando cada una con un par de miembros como mínimo. Algunos miembros de esta familia son modificados por miristoilación, palmitoilación o ambas (Mumby, Kleuss y Gilman, 1994; Linder, *et al*, 1993). Estas lipidaciones regulan la asociación de las subunidades  $G\alpha$  a la membrana. La palmitoilación es reversible y modifica, por lo tanto, de manera dinámica la conducta de la subunidad  $G\alpha$  (Wedegaertner y Bourne, 1994; Casey, 1994). Por otro lado, se ha propuesto que la función de algunas proteínas G puede ser regulada por fosforilación; por ejemplo,  $G\alpha_{12}$  y  $G\alpha_z$  pueden ser fosforiladas *in vivo* en residuos de serina y treonina (Linsbury, *et al*, 1991). El papel de la fosforilación en este sistema es quizá el de regular el ensamble de los diversos complejos macromoleculares en los que las proteínas G intervienen (Neer, 1995). Para el caso de Gq/G11, que se expresan naturalmente en los fibroblastos Rat-1, la transformación de estas células con el oncogen *v-src*, incrementa la fosforilación de las mencionadas proteínas G, provocando un aumento en su actividad (Liu, Mattingly y Garrison, 1996).

El dímero  $\beta\gamma$  forma un complejo estrechamente unido que puede ser disociado únicamente bajo condiciones desnaturalizantes. Tradicionalmente este dímero ha sido responsabilizado de incrementar la afinidad de la subunidad  $G\alpha$  con el receptor al que

se acopla y de contribuir a la asociación de ella con la membrana plasmática. Sin embargo, estudios recientes demuestran una gran versatilidad funcional del dímero  $\beta\gamma$ . Por ejemplo, ha sido ubicado en la vía de activación de Ras por parte de receptores acoplados a proteínas G (Crespo, *et al*, 1994; Koch, *et al* 1994). Incluso se ha detectado que es capaz de interactuar directamente con la cinasa Raf, ubicada en la vía de la cinasa activada por mitógenos, que conduce a proliferación celular (Pumiglia, *et al*, 1995). También se ha determinado que puede participar en la estimulación de la adenilil ciclasa tipo II (Inglese, *et al*, 1994). Entre los eventos celulares que requieren de la participación de este dímero conviene destacar, para los fines de este trabajo, su participación en la translocación de cinasas específicas para los receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y su propiedad de estimular a algunas isoformas de la fosfolipasa C (Pitcher, *et al* 1995; Lee *et al* 1993; Smrcka y Sternweis 1993; Sternweis, 1994). Las subunidades  $G\beta$  tienen un peso molecular cercano a los 36 kDa y comparten una homología entre ellas que va del 50 al 80 %. Por su parte, la subunidad  $G\gamma$  es la más pequeña del grupo, todos sus miembros, de entre 6 y 9 kDa, sufren de isoprenilación en su extremo carboxilo-terminal quedando ancladas, de manera permanente, a la membrana plasmática, evento indispensable para su función (Muntz, *et al*, 1992).

Las proteínas G heterotriméricas median una gran variedad de señales intracelulares debido a que son intermediarias en el acoplamiento de receptores de siete dominios transmembranales con diferentes moléculas efectoras; por ejemplo con varias isoformas de la adenilil ciclasa y de la fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol(4,5)bisfosfato. La activación de la adenilil ciclasa da como resultado la producción de AMP cíclico y por consiguiente la activación de la cinasa que depende de la presencia de éste (PKA). La fosfolipasa C cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol(4,5)bisfosfato para generar diacilglicerol e inositol trisfosfato, éstos llevan a la activación de la proteína cinasa C y a la movilización de calcio intracelular, respectivamente. Las diferentes isoformas de la fosfolipasa C parecen ser activadas por diferentes receptores y en algunos casos por distintos componentes del heterotrímero de proteínas G. Actualmente

se han caracterizado cuatro isoformas de fosfolipasa C tipo  $\beta$  (que es la que responde a la estimulación de receptores acoplados a proteínas G), todas ellas son activadas en diferente grado por la subunidad  $\alpha_q$  de las proteínas G (Taylor, *et al*, 1991; Smrcka, *et al* 1991). En tanto que las isoformas  $\beta_2$  y  $\beta_3$  también pueden ser activadas por el dímero  $\beta\gamma$  (Smrcka y Sternweis, 1993; Bong-Lee, *et al*, 1993).

#### **IV. RECEPTORES PARA FACTORES DE CRECIMIENTO.**

Muchos receptores, particularmente para factores de crecimiento, cuentan con un dominio extracelular, de unión al ligando, y un dominio intracelular, poseedor de actividad catalítica de cinasa, que muestra especificidad por residuos de tirosina. La unión del factor de crecimiento adecuado se acompaña de la dimerización y autofosforilación de los receptores. En los receptores para factor de crecimiento epidérmico y para factor de crecimiento derivado de plaquetas, los sitios de autofosforilación están en regiones no catalíticas del dominio carboxilo-terminal citosólico (Malarkey, *et al*, 1995). La principal función de estos sitios, una vez fosforilados, es reclutar a efectores intracelulares, estimulando su función. Así pues, la unión del ligando permite que el dominio intracelular de estos receptores sirva como foco de concentración de proteínas tales como la fosfolipasa C $\gamma$ , la cinasa del fosfatidilinositol-(4,5) bisfosfato, la cinasa Src y algunas proteínas acopladoras que son fundamentales para la activación de Ras, todas ellas pueden contribuir, de manera coordinada, a generar una respuesta mitogénica, mediada por cascadas de fosforilación (Marshall, 1995).

#### **V. MODULOS PROTEICOS.**

Las interacciones proteína-proteína, necesarias para la transmisión de una señal intracelular, ocurren por medio de módulos específicos, de estructura conservada, que forman parte de la secuencia primaria de muchas proteínas efectoras y adaptadoras (Cohen, Ren y Baltimore, 1995). Los dominios llamados SH2, presentes en distintas

proteínas participantes de las cascadas de transducción derivadas de la activación de receptores para factores de crecimiento, tienen la capacidad de unirse a residuos de tirosina fosforilados y ubicados en un contexto particular, que permite la selección del efector apropiado. Por otra parte, los dominios conocidos como SH3 se asocian a regiones ricas en prolina que se exponen por un cambio conformacional de la proteína portadora, como resultado de la transmisión de una señal intracelular. Por otra parte, otro dominio proteico que está adquiriendo gran relevancia, es el dominio denominado PH (llamado así por su homología con la proteína plectrina); éste se encuentra distribuido en diversas proteínas, incluyendo cinasas con especificidad por serina/treonina o tirosina, isoformas de la fosfolipasa C, reguladores de las proteínas G de bajo peso molecular y proteínas estructurales del citoesqueleto, entre otras (Inglese, *et al*, 1995; Cohen, Ren y Baltimore, 1995). Recientemente se describió que los dominios PH son capaces de unirse a fosfolípidos, particularmente fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato (Harlan, *et al*, 1994), así como al heterodímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G, por lo que se cree que su función principal es regular la interacción de proteínas con la membrana (Pitcher, *et al*, 1995; Touhara, *et al*, 1994). Un ejemplo particularmente interesante en el que los dominios PH regulan la interacción de una proteína con la membrana plasmática, y con el dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G, es la cinasa del receptor  $\beta$  adrenérgico, que será descrita más adelante. Muchas proteínas que participan en transducción de señales poseen dominios SH2, SH3 y PH, ya sea individuales o en combinación; así mismo, éstas y otras proteínas poseen sitios de unión para tales dominios. Las interacciones proteicas resultantes son importantes para el señalamiento del camino de la superficie celular al núcleo, para el tráfico de proteínas y su localización subcelular, para el control de la forma celular y para la interacción célula a célula. Experimentos bioquímicos han demostrado que estos módulos proteicos organizan y regulan redes de interacciones extremadamente versátiles y complejas que se encargan de expresar las respuestas celulares al medio (Cohen, Ren y Baltimore, 1995).

## VI. COINCIDENCIAS EN LAS SEÑALES TRANSMITIDAS POR RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G Y RECEPTORES PARA FACTORES DE CRECIMIENTO.

Hasta hace poco, los mecanismos transductores de señales intracelulares eran supuestos como cascadas bioquímicas lineales e independientes. Uno de los grandes grupos transductores, el de los receptores acoplados a proteínas G antes mencionado, informa de la presencia de diversas hormonas y neuromoduladores, y coordina respuestas tales como contracción o secreción, contando para ello con un equipo de proteínas que incluye a las proteínas G heterotriméricas y a efectores del tipo de la adenilil ciclasa y de la fosfolipasa C, particularmente del subtipo  $\beta$ . Otro equipo señalador, particularmente el de los receptores para factores de crecimiento, emplea a cinasas con especificidad por residuos de tirosina, a proteínas adaptadoras y a proteínas G de bajo peso (Ras) para regular la proliferación y diferenciación celulares. Por largo tiempo se pensó que estos equipos transductores se mantenían independientes, sin embargo, evidencias experimentales recientes involucran transacciones activas entre ambos grupos (Bourne, 1995; Malarkey, *et al*, 1995). La proteína adaptadora conocida como SHC ha sido colocada en el punto de coincidencia entre ambas vías de transducción; su fosforilación resulta de la activación de receptores para factores de crecimiento y de aquellos acoplados a proteínas G, varios de los cuales conducen a la generación de cascadas de fosforilación en tirosina que pueden llevar a respuestas proliferativas (Chen, *et al*, 1996). Así pues, algunos receptores acoplados a proteínas G actúan de una manera muy similar a la de los factores de crecimiento "clásicos". La proteína adaptadora SHC requiere ser fosforilada en residuos de tirosina para poder formar parte de complejos moleculares mayores. La cinasa Pyk2, recientemente descubierta, cataliza la anterior fosforilación en respuesta a diversos estímulos que generan un aumento del calcio intracelular (Lev, *et al*, 1995). Por otra parte, las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G se consideran clave para la inducción de una respuesta proliferativa (Crespo, P, *et al*, 1994; Hawes, *et al*, 1996) y para la activación de cascadas de fosforilación en tirosina, por parte de los receptores de



siete dominios transmembranales (Inglese, *et al*, 1995; Koch, *et al*, 1994); la prueba experimental que sugiere lo anterior es la fosforilación de SHC, la activación de Ras y la activación de la cinasa activada por mitógenos, todos estos efectos son bloqueados cuando se introduce la expresión de una forma truncada de la cinasa GRK2, cuyo dominio carboxilo terminal, en el que está presente un dominio PH, se une al dímero  $\beta\gamma$  y bloquea sus acciones. Probablemente la proteína Gi es la proveedora del dímero  $\beta\gamma$  mencionado; ya que la señal referida se bloquea en células preincubadas con la toxina pertussis (van Biesen, *et al*, 1995).

#### VII. VIA DE RECAMBIO DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO.

La fosfolipasa C (PLC), cuyo sustrato específico es el fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato, genera diacilglicerol e inositol(1,4,5)trisfosfato como resultado de diversos estímulos celulares (Harden, 1992). Como consecuencia se activa la proteína cinasa C, además de conducir a la liberación de calcio de reservorios intracelulares. Una vez que el inositol(1,4,5)trisfosfato difunde en el citosol y se une a sus receptores, situados en el retículo endoplásmico, se abren canales, formados por tetrámeros de éstos, que permiten la salida del calcio almacenado en el organelo (Clapham, 1995; Figura No. 3).

El diacilglicerol producido por degradación del fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato es rápidamente metabolizado, pudiendo servir como fuente para la generación de ácido araquidónico, que por sí mismo actúa como mensajero o sirve de fuente para la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (Alberts, *et al*, 1994). De tal forma que la activación de varias isoformas de la proteína cinasa C, debida a la presencia del diacilglicerol, generado por esta vía, es un evento transitorio. Sin embargo, las acciones que requieren de la activación mantenida de la proteína cinasa C son factibles gracias a la generación de diacilglicerol por vías alternas, tales como la de la digestión de la fosfatidilcolina (Nishizuka, 1995).

Actualmente se conocen tres grupos de PLC ( $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) que hidrolizan específicamente al fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato. Todas las isoformas comparten dos regiones de alta homología, precedidas de un dominio PH, además, la PLC $\gamma$  cuenta con dominios SH2 y SH3; estos módulos proteicos, que fueron referidos en una sección anterior, son fundamentales para las interacciones requeridas en la transmisión de la señal hacia el interior celular. El mecanismo de activación de la PLC depende de la isoforma de la que se trate, la PLC $\beta$  es activada por los receptores de siete dominios transmembranales, con la participación de una proteína G; por su parte, la PLC $\gamma$  responde a fosforilación en tirosina por receptores que poseen esta actividad, o bien por cinasas citosólicas (Bong-Lee y Ree, 1995). La PLC $\beta$  es regulada tanto por una subunidad de la familia G $\alpha_q$  como por el dímero  $\beta\gamma$ , a través de su interacción con distintas regiones de la enzima. La sensibilidad de las distintas isoenzimas de este grupo, ante la presencia de las

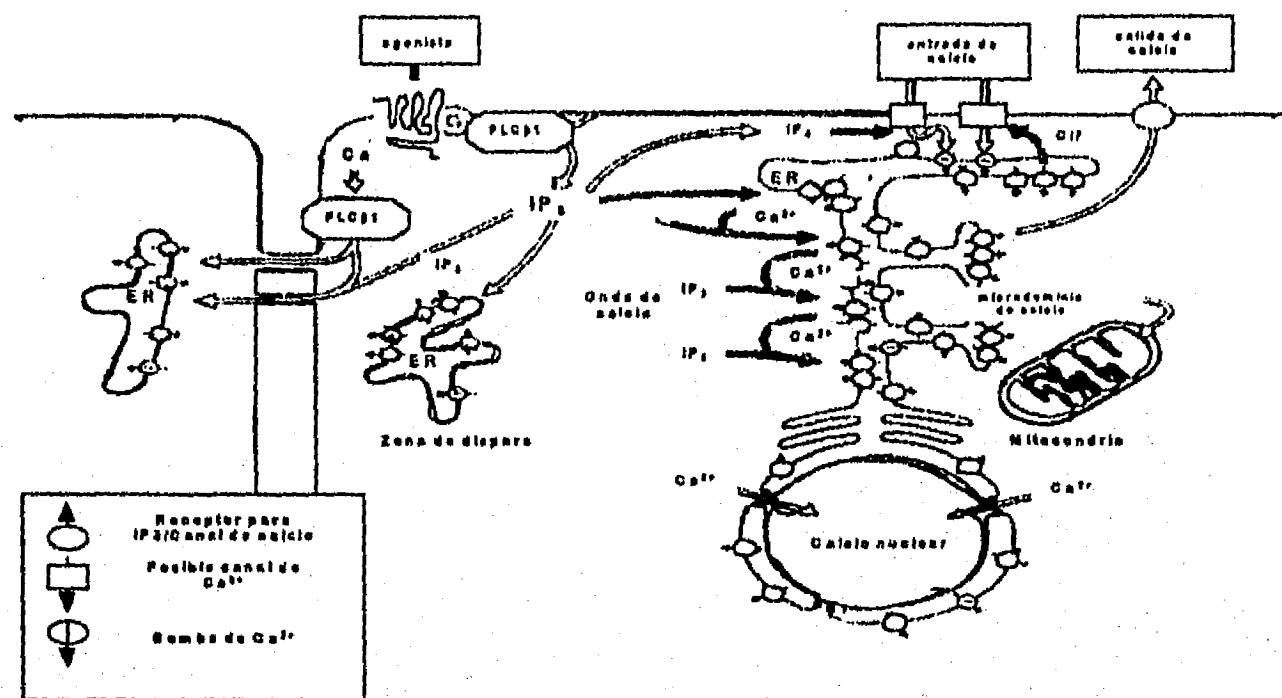


Figura No. 3. Diagrama esquemático de la vía de recambio de fosfolinosídeos-calcio. La señal es generada una vez que un receptor acoplado a una proteína G, de la familia Gq, por ejemplo algún miembro de la familia de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, es activado por su respectivo agonista. El siguiente paso es la activación de la fosfolipasa C $\beta$  que hidroliza al fosfatidilinositol(4,5)bisfosfato, generando diacilglicerol e inositol trifosfato (IP $_3$ ); el primero activa a la proteína cinasa C (no mostrado en el esquema) y el IP $_3$  se une a sus receptores en el retículo endoplásmico, causando la liberación de calcio almacenado en este organelo; el calcio liberado puede contribuir a la salida de más calcio, antes de ser lanzado hacia el exterior celular o transportado de regreso a organelos de almacenamiento, como el retículo y la mitocondria. También puede alcanzar una localización nuclear. La liberación inicial de calcio de los reservorios intracelulares puede ser seguida de entrada de calcio extracelular, a través de canales regulados desde adentro, para ello se ha propuesto la participación del inositol-tetrafosfato (IP $_4$ ) o de un factor de influjo de calcio (CIF). Figura modificada de Miyazaki, 1995.

subunidades mencionadas, es variable, contribuyendo así a la especificidad de las señales transmitidas. De esta forma, la vía "clásica" de activación es a través de receptores acoplados a alguna proteína G de la familia de  $G_q$ , sin embargo; existen varios ejemplos de receptores acoplados a  $G_i$ , de los cuales tradicionalmente se ha dicho que modulan negativamente a la adenilil ciclasa, que al ser estimulados son capaces de generar recambio de fosfoinosítidos. Esta vía de activación es bloqueada por la toxina pertussis, a diferencia de la vía "clásica" que es resistente. Se ha sugerido que esta modulación de la actividad de la PLC, por proteínas  $G_i$ , esta mediada por las subunidades  $\beta\gamma$  liberadas; además, conviene recordar que las proteínas del grupo de  $G_i$ , son las que se encuentran con mayor abundancia, por lo que se esperaría que la concentración del dímero  $\beta\gamma$ , disponible luego de la disociación del heterotrímero  $G_i$ , sea suficiente para la activación de las formas sensibles de PLC (Exton, 1994).

#### VIII. PROTEINA CINASA C

El nombre de proteína cinasa C (PKC) se ha usado para referirse a una familia de cinasas que fosforilan en residuos de serina y treonina y que han sido divididas en tres categorías, de acuerdo a sus requerimientos de cofactores: PKCs convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\gamma$ ) que además de fosfatidil-serina requieren calcio y diacilglicerol; PKCs no convencionales ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\sigma$ ) que difieren de las anteriores en que no dependen de la presencia de calcio para su activación; los dos grupos mencionados pueden ser estimulados por ésteres de forbol como sustitutos del diacilglicerol; por último, tenemos a las formas atípicas ( $\zeta$  y  $\lambda$ ) que no dependen de la presencia de los cofactores antes referidos (Jaken, 1996; Kiley y Jaken, 1994). En el caso de la PKC  $\zeta$ , algunos investigadores han sugerido que su activación requiere del fosfatidil-inositol(3,4,5)trisfosfato, producto de la actividad de una cinasa que lo fosforila en posición 3 (Nakanishi, Brewer y Exton, 1993). Todos los miembros de la familia de la PKC comparten una estructura similar; cuentan con un dominio regulador, localizado en el extremo amino-terminal, que posee el sitio de unión a la fosfatidil-serina y a los ésteres

de forbol; el dominio carboxilo-terminal cuenta con la región catalítica, donde se une el ATP y el sustrato; ambos dominios están unidos por una región flexible (Kiley y Jaken, 1994).

La activación selectiva de las isoformas individuales de la PKC, en una célula que expresa varias de ellas (tal es la situación más frecuente), coordina la selectividad de la respuesta; por ejemplo, las formas no convencionales, que no requieren de calcio, aparentemente pueden ser estimuladas por agonistas que estimulan la actividad de la fosfolipasa D, misma que genera diacilglicerol, sin modificar la concentración citosólica del calcio; en tanto que las formas convencionales responden a la estimulación de receptores que afectan a la vía de fosfoinosítidos-calcio, que da lugar tanto a diacilglicerol como a un aumento en la concentración de calcio en el citosol (Nishizuka, 1995). Diversos estudios de fosforilación *in vitro* indican que las distintas isoformas de la PKC aparentemente carecen de especificidad para fosforilar a un determinado sustrato. Así pues, la especificidad que ellas muestran *in vivo* depende, además de sus diferentes requerimientos, muy probablemente, de su distribución subcelular. Existen numerosos ejemplos en los que la PKC cambia de localización cuando es activada y esta migración en el interior de la célula puede llevarla al núcleo, a la membrana plasmática, o a interaccionar con fibras del citoesqueleto; entre otros lugares donde seguramente los sustratos que identifica son diferentes (Wilkinson y Hallam, 1994; Mochly-Rosen, *et al*, 1990). Así pues, ante un mismo estímulo, el desplazamiento que sufran las distintas isoformas, presentes en una célula, va a ser diferente, incluso algunas de ellas pueden no verse afectadas. Recientemente se han identificado a proteínas intracelulares que reconocen exclusivamente a la forma activa de la PKC y que, no siendo sustratos para ella, parecen actuar como receptores que regulan la translocación subcelular mencionada (Mochly-Rosen, 1995; Ron, *et al*, 1994; Robles-Flores, García-Sánz, 1994).

## IX. DESENSIBILIZACIÓN.

Muchos de los receptores acoplados a proteínas G regulan la acción de sus agonistas cuando estos se presentan de manera repetida o persistente. En esta situación, la respuesta al estímulo hormonal se observa disminuida, o incluso ausente, este fenómeno es conocido como desensibilización (revisado por Lohse, 1993). La desensibilización rápida, que se detecta luego de un estímulo hormonal agudo, generalmente esta mediada por fosforilación del receptor. Esta fosforilación es llevada a cabo por diferentes cinasas, que probablemente actúen de forma secuencial. Entre ellas destacan las cinasas activadas por los receptores (GRKs) y aquellas activadas por segundos mensajeros (PKC, que depende de diacilglicerol y para varias isoformas también de calcio; y PKA, activada por el incremento intracelular en el AMP cíclico); todas ellas son llevadas a la membrana donde sus sustratos respectivos, los receptores, en el caso de ambos tipos de enzimas y algunos otros intermediarios de la vía de transducción son fosforilados por las cinasas activadas por segundos mensajeros (Sibley, *et al*, 1987). La movilización de las cinasas es un factor clave en la regulación del sistema, el "poner" juntos a las cinasas y a sus sustratos es indispensable para la fosforilación de éstos; para tal efecto participan receptores membranales específicos para la PKC, conocidos como receptores para la PKC activada (Mochly-Rosen, 1995). El dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G permite la translocación de la GRK2 (también llamada  $\beta$ ark-1 debido a su capacidad de fosforilar al receptor  $\beta_2$  adrenérgico). Se conoce que el dominio de interacción de la  $\beta$ ark-1 con el dímero  $\beta\gamma$  se localiza en el extremo carboxilo-terminal de la cinasa. La sobreexpresión del carboxilo-terminal de la  $\beta$ ark-1, por transfección del cDNA respectivo, ha sido una herramienta experimental muy útil para demostrar diversas acciones celulares mediadas por el dímero  $\beta\gamma$  (Inglese, *et al*, 1994 y 1995).

La desensibilización homóloga a la acción de hormonas y neurotransmisores es un mecanismo regulador común de la función de diversos receptores. Se caracteriza por una pérdida rápida y específica en la capacidad de activación de éstos, cuando han sido

estimulados de manera repetida por el agonista. En la familia de receptores acoplados a proteínas G, este proceso ha sido particularmente estudiado en la rodopsina que es el receptor que media la fototransducción en células retinales, y en el receptor  $\beta_2$  adrenérgico en el que su activación, inducida por catecolaminas, lleva a la estimulación de la adenilil ciclasa. La PKA, activada por el AMP cíclico, es capaz de fosforilar y desensibilizar al receptor  $\beta_2$  adrenérgico cuando éste ha sido estimulado o bien cuando el AMP cíclico intracelular se incrementa en respuesta a otros estímulos. Por otro lado, los receptores antes mencionados también son fosforilados por cinasas específicas que, según se conoce hasta ahora, sólo tienen como sustratos a miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, por lo que se les conoce como GRKs (por cinasas de receptores acoplados a proteínas G; Lefkowitz, 1993). Las GRKs tienen la característica de fosforilar exclusivamente a los receptores que han sido activados por su ligando y en los que probablemente los sitios de fosforilación quedan accesibles como consecuencia del cambio conformacional que adoptan (Premont, Inglese y Lefkowitz, 1995). No obstante la extensa información concerniente a la regulación del grupo de receptores que modulan positivamente a la adenilil ciclasa, poco es lo que aún se conoce del mismo proceso en los receptores que se acoplan al sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio (Wojcikiewicz, Tobin y Nahorski, 1993). En este caso, la participación de cinasas específicas de los receptores y de aquellas reguladas por segundos mensajeros (particularmente la PKC) ha sido difícil de conciliar. Por un lado, existen ejemplos en los que la depleción de las formas de PKC sensibles a ésteres de forbol no tiene mayor efecto en el proceso de desensibilización homóloga y por otro lado, algunos ejemplos evidencian una disminución en la acción hormonal cuando las células sufren un tratamiento agudo con ésteres de forbol y, más aún, en casos particulares, la utilización de inhibidores considerados específicos para la PKC ha revelado resultados contradictorios en cuanto a la participación de la misma en la desensibilización homóloga.

Los receptores acoplados al sistema de recambio de fosfoinosítidos sufren desensibilización cuando son sometidos a un estímulo crónico. Sin embargo, un estudio

más detallado de este sistema se ha enfrentado a dificultades técnicas, debido a que los fosfatos de inositol tienen una vida media muy corta, y no existen inhibidores específicos de las enzimas que los degradan. Por su parte, el estudio de los receptores acoplados a la producción de AMP cíclico se sirve de inhibidores específicos, que impiden la degradación de este segundo mensajero, permitiendo una evaluación más acertada (Wojcikiewicz, Tobin y Nahorski, 1993).

Experimentos recientes sugieren una participación secuencial de las cinasas de los receptores acoplados a proteínas G y de las cinasas moduladas por segundos mensajeros. Particularmente la GRK2 es sustrato de fosforilación *in vitro* de la PKC, dicha fosforilación parece aumentar su actividad, o bien su capacidad para asociarse a membranas, o tal vez ambas. En vista de que la localización subcelular de estas enzimas es fundamental para su acción biológica, resulta relevante la posibilidad de que la PKC pueda regular la translocación y actividad de la GRK2 (Winstel, *et al*, 1996; Chuang, LeVine, y DeBlasi, 1995).

Diversos eventos resultantes de la ocupación del receptor pueden modular la eficiencia de la transducción de la señal, estos incluyen fosforilación de los receptores, compartimentalización de los mismos y cambio en el número total de ellos o al menos de aquellos disponibles en la membrana plasmática. A continuación se señalan algunas de las características de cada uno de estos eventos:

**a) Fosforilación de los receptores.**

La ocupación de diversos receptores acoplados a proteínas G por su respectivo agonista, en particular en el caso de aquellos que modulan la actividad de la adenilil ciclase, resulta en la activación de cinasas específicas del receptor (por ejemplo las cinasas del receptor  $\beta$  adrenérgico, también conocidas como  $\beta$ ark 1 y 2 ó GRK 2 y 3 respectivamente). La fosforilación del receptor conduce a desacoplamiento de la proteína

G y pérdida de la actividad funcional (Sibley, DR *et al*, 1987). Para el caso de receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos, la evidencia de fosforilación de los mismos es bastante escasa (Tobin y Nahorski, 1993; Ali, *et al*, 1994; Alaluf, *et al*, 1995; Opperman, *et al*, 1996); un ejemplo de que ésta ocurre es el receptor  $\alpha_1$  adrenérgico presente en células de músculo liso de la línea DDT1-MF2; en ellas, la fosforilación mediada por el agonista coincide con el desacoplamiento de la PLC (Leeb Lundberg, *et al*, 1985 y 1987). Sin embargo, la fosforilación de este receptor, por activación de la PKC ha sido claramente demostrada y así mismo, la intervención de una GRK ha sido sugerida (Leeb Lundberg, *et al*, 1985; Lattion, Diviani y Cotecchia, 1994; Diviani, *et al*, 1996). Así pues, son necesarios más estudios para discernir el papel que cada una de las cinasas juega en la regulación del proceso.

#### **a.1) Cinasas de los receptores acoplados a proteínas G.**

Las cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs) son una familia de enzimas que fosforilan residuos de serina y treonina presentes en los receptores de siete dominios transmembranales. Las GRKs reconocen, exclusiva y específicamente, a la forma activa de los receptores acoplados a proteínas G, es decir, con ligando unido. La fosforilación de un receptor de esta familia, por una GRK, resulta en un bloqueo de la señal que estaba siendo transmitida por el receptor, esto ocurre por el desacoplamiento o separación del receptor y la proteína G heterotrimérica. Se conocen seis miembros de la familia de cinasas GRKs, cada uno de ellos difiere en su distribución tisular y en sus mecanismos reguladores (Inglese, *et al*, 1993; Premont, Inglese y Lefkowitz, 1995, Lefkowitz, 1993). Los receptores fosforilados por una GRK se convierten en blancos para la unión de proteínas llamadas arrestinas, éstas bloquean el acoplamiento entre el receptor y la proteína G, reduciendo de manera efectiva, los niveles funcionales de receptor en la membrana plasmática. La estructura de las GRKs comprende un dominio catalítico central, flanqueado hacia el lado amino por una región que, según se cree, determina el reconocimiento del receptor activado que va a servir como sustrato y una



región carboxilo-terminal encargada de la localización subcelular de la enzima. Los miembros más conocidos de esta familia de cinasas son la cinasa de la rodopsina (o GRK1) y la cinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico (también conocida como  $\beta$ ark o GRK2). La primera se localiza principalmente en las células retinales, mientras que la segunda (y también una tercera conocida como  $\beta$ ark2 o GRK3) tienen una distribución mucho más amplia. Las GRKs antes mencionadas se localizan en el citosol y se mueven hacia la membrana cuando los receptores, que son sus sustratos, se enfrentan a la presencia de su agonista. Es un hecho demostrado que un mismo tipo de GRK es capaz de fosforilar a distintos receptores de siete dominios transmembranales que hayan sido activados. Por ejemplo, la GRK2 además de fosforilar al receptor  $\beta_2$  adrenérgico (Benovic, *et al*, 1986) puede fosforilar al  $\alpha_2$  adrenérgico (Eason, Moreira y Liggett, 1995) y al receptor para trombina (Ishii, *et al*, 1994), entre otros. La manera en que las distintas GRKs interaccionan con la membrana es particular para cada una de ellas: la GRK1 y 6 tienen lípidos unidos, la GRK5 posee una región con fuerte carga positiva que le permite asociarse con los lípidos de carga negativa, abundantes en la cara citosólica de la membrana. Por su parte, las  $\beta$ arks, que inactivas se distribuyen en el citosol, se desplazan a la membrana cuando el receptor que va a ser su sustrato es activado; en la membrana interaccionan con el dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G que queda libre cuando estas son activadas (Kim, Dion y Benovic, 1993; Boekhoff, *et al*, 1994; Pitcher, *et al*, 1995; Touhara, *et al*, 1994). Este último es un mecanismo regulador particularmente interesante, ya que el dímero  $\beta\gamma$  se encuentra disponible solamente cuando un receptor es estimulado por su ligando y conduce a la disociación del heterotrímero respectivo de proteínas G. Así, se controla de manera precisa el sitio en que ocurrió la activación y las GRKs son llevadas al punto exacto, y en el momento oportuno, en el que su función reguladora es requerida (Premont, Inglese y Lefkowitz, 1995; Lefkowitz, 1993; Inglese, *et al*, 1993).

#### **a.2) Arrestinas.**

Las arrestinas son proteínas que juegan un papel importante en el bloqueo de la

transducción de la señal iniciada por los receptores acoplados a proteínas G. La intervención de estas proteínas en el marco del proceso de desensibilización homóloga, se sitúa inmediatamente después de la fosforilación del receptor. El bloqueo de la señal ocurre gracias a la capacidad de la arrestina de disminuir directamente el acoplamiento del receptor con la proteína G (Lohse, *et al.* 1990.). Las arrestinas de mamíferos comprenden, entre otras, a la arrestina visual, cuya función principal es bloquear a la fototransducción; la  $\beta$ -arrestina, que trabaja en la desensibilización del receptor  $\beta_2$  adrenérgico; la arrestina 3 (también conocida como  $\beta$ -arrestina 2) que es capaz de interactuar con el receptor  $\beta_2$  adrenérgico y posiblemente con receptores del olfato. Algunas de las arrestinas mencionadas pueden estar representadas por diversas variantes, hasta la fecha poco se conoce del significado funcional de cada una de ellas (Sterne-Marr, *et al.* 1993; Parruti, *et al.* 1993; Smith, *et al.* 1994.). En vista de la tremenda diversidad en el número de receptores acoplados a proteínas G, en comparación con el número reducido de arrestinas y GRKs conocidas, surge la posibilidad de que éstas sean capaces de intervenir en el bloqueo de más de un receptor diferente. De hecho, recientemente ha sido demostrado que la arrestina visual es la que mayor especificidad tiene para interactuar con la rodopsina fosforilada (su sustrato natural); en tanto que la  $\beta$ -arrestina y la arrestina 3 fueron capaces de interactuar con la forma fosforilada de varios receptores estudiados (Rodopsina,  $\beta_2$  adrenérgico y muscarínico m2; todos ellos acoplados a sistemas de transducción distintos). Particularmente la arrestina 3 mostró poca habilidad de reconocimiento específico entre ellos. Los elementos estructurales que contribuyen a la unión de las arrestinas incluyen: 1) Una región ácida, situada en el extremo carboxilo-terminal, que controla el reconocimiento de la forma fosforilada y activada del receptor, sin participar directamente en la interacción con éste; 2) una región básica, de ubicación amino-terminal, que participa directamente en la interacción con el receptor y que juega un papel regulador por medio de interacción con la región ácida ya mencionada y 3) dos dominios centrales que participan directamente en la unión específica y selectiva del receptor (Gurevitch, *et al.* 1995). De acuerdo al estudio antes referido, sólo se requieren dos moles de fosfato por mol de receptor para conseguir una

unión de alta afinidad de la arrestina con el receptor fosforilado; sin embargo, diversos estudios han demostrado que los receptores pueden ser fosforilados a estequiometrías de 8 a 12 moles de fosfato por mol de receptor (particularmente en ensayos *in vitro*), sugiriendo que estos niveles de fosforilación tan elevados pueden actuar directamente en el bloqueo del acoplamiento entre el receptor en cuestión y la proteína G.

### **a.3) Desensibilización heteróloga por la proteína cinasa A**

El aumento en la concentración de AMP cíclico ejerce, a través de la PKA, efectos reguladores a distintos niveles de la cascada de transducción; frecuentemente, la activación de la PKA se asocia a la inhibición de la hidrólisis de fosfoinosítidos estimulada por receptores. Recientemente se demostró que el sistema de la PLC, activado por las proteínas G, puede ser regulado por el sistema de la adenilil ciclasa mediante la intervención de la PKA. En concreto, se detectó que la PKA inhibe específicamente la actividad de la PLC $\beta_2$  estimulada por G $\beta\gamma$  pero no la de las isoformas de PLC activadas por la subunidad  $\alpha$ . Más aún, la PKA fosforila directamente a la PLC $\beta_2$  en residuos de serina, demostrando así una regulación cruzada entre dos vías de transducción de señales mediadas por las proteínas G (Liu y Simon, 1996).

La activación prolongada de la adenilil ciclasa puede conducir a una disminución en el número de receptores que conducen al recambio de fosfoinosítidos. Por ejemplo, en células CHO cotransfectadas con los receptores  $\beta_2$  adrenérgico (que a través de una proteína Gs estimulan a la adenilil ciclasa) y muscarínico m1 (activador del recambio de fosfoinosítidos), la estimulación prolongada de los  $\beta_2$  adrenérgicos resulta en una disminución en el número de muscarínicos. Este efecto puede ser generado por la estimulación directa de la adenilil ciclasa con forskolina o en presencia de análogos no hidrolizables del AMPc (Lee y Fraser, 1993). Sin embargo, en otras células, el estímulo crónico en la producción de AMPc lleva a una mejor respuesta del recambio de fosfoinosítidos; tal es el caso de la acción de los receptores para bradicinina en células

MC3T3-E1, en las que además se detecta un aumento en el número de receptores para esta hormona, que puede ser bloqueado si se inhibe la síntesis de proteínas o RNA (Banno, Sakai y Nozawa, 1993).

#### **a.4) Regulación por la proteína cinasa C.**

La activación de la PKC atenúa la actividad de la vía de recambio de fosfoinosítidos activada por diferentes receptores acoplados a proteínas G (Wojkiewicz, Tobin y Nahorski, 1993). Los blancos potenciales de acción de la PKC incluyen al receptor, la Gq y la PLC; entre otros (García-Sáinz, 1991). La posibilidad de que la PKC forme parte de un mecanismo de regulación negativa se ve fortalecida por la observación, en diversas células, de que el abatimiento en el contenido de esta enzima, por incubación prolongada con ésteres de forbol, resulta en un incremento en el recambio de fosfoinosítidos estimulado por receptores, resultado congruente con la remoción de una influencia inhibitoria. Sin embargo, el papel de esta enzima en la regulación de estos receptores permanece sin prueba definitiva; lo que sería particularmente relevante para evaluar el papel funcional de la PKC en la fase inicial rápida de la desensibilización de la hidrólisis de fosfoinosítidos, ya que ésta parece no estar influenciada por la inclusión de inhibidores de la enzima, o por tratamientos crónicos con ésteres de forbol. No obstante, la participación de la PKC se ha considerado necesaria para el proceso de internalización de receptores que, como se mencionó previamente, forma parte del proceso de adaptación, a largo plazo, a una exposición crónica al agonista (por ejemplo, Benya, *et al*, 1995; Fonseca, Button y Brown, 1995). En este último proceso, el dominio carboxilo terminal está aparentemente implicado en los distintos receptores. Así mismo, la inhibición de la actividad de la PKC o de la internalización, puede dar lugar a respuestas más prolongadas. Cabe destacar que la internalización y el reciclaje de los receptores tiene particular importancia para la resensibilización de los mismos.

**b) Compartimentalización de los receptores.**

Diversos receptores enfrentados a la presencia constante de su agonista sufren atenuación en el acoplamiento que conduce a la respuesta celular, pudiendo llegar a respuestas adaptativas a plazos prolongados, basadas en la internalización o secuestro de los receptores hacia compartimentos intracelulares. A temperatura fisiológica, los receptores secuestrados pueden ser llevados de regreso a la membrana plasmática. Desde luego, la internalización de los receptores resulta en su desacoplamiento de los sistemas de transducción. Por ejemplo, los receptores muscarínicos presentes en células de neuroblastoma de la línea SK-N-SH son internalizados cuando éstas se exponen a carbacol durante una hora a 37 °C y el regreso de éstos a la superficie se previene si las células son incubadas a 10 °C, inhibiéndose su funcionalidad (Baumgold, Cooperman y White, 1989). No se conocen los mecanismos moleculares que regulan la internalización de los receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos pertenecientes a la familia de receptores que poseen siete dominios transmembranales. En general, el inicio del proceso de internalización ocurre pasados cinco minutos a partir del estímulo, por lo que se piensa que este evento resulte secundario a la fase rápida de atenuación de la respuesta (Wojcikiewicz, Tobin y Nahorski, 1993).

Un caso interesante en el que la internalización parece ser un mecanismo rápido de desensibilización es el del receptor para factor de crecimiento epidérmico expresado en el parénquima hepático. Estos receptores, en presencia de su ligando, son transportados a compartimentos intracelulares con tal rapidez que en 30 segundos ya puede registrarse un decremento mayor al 50% de los receptores que originalmente estaban situados en la membrana plasmática; este proceso ha sido considerado una forma de atenuación o desensibilización, ya que el receptor secuestrado queda alejado de sus moléculas efectoras, particularmente p21Ras, que se encuentra asociada a la membrana plasmática. De hecho, una mutante truncada de este receptor, que mantiene su actividad catalítica pero es resistente al secuestro hacia endosomas, conduce a un incremento en la

proliferación celular y lleva a la transformación de la línea celular NR6 (Di Guglielmo, *et al*, 1994; Baass, *et al*, 1995; Bar-Sagi, *et al*, 1988 y Wells, *et al*, 1990).

**c) Disminución del número de receptores.**

Muchos receptores ubicados en la superficie celular, al ser estimulados crónicamente, siguen una vía de internalización que puede conducir a degradación proteolítica, dando como resultado una disminución neta en el número de receptores celulares (Benya, *et al*, 1995; Svoboda y Milligan, 1994). Para el caso de los receptores acoplados al sistema de recambio de fosfoinosítidos que sufren internalización y degradación, las características comunes de este tipo de regulación son las siguientes: (i) responden a periodos de incubación prolongados en presencia del agonista, (ii) la respuesta celular a un nuevo estímulo permanece disminuida, si bien sin detectarse cambios en la dosis capaz de estimular la mitad de la respuesta máxima, (iii) este tipo de regulación es homóloga y (iv) se precisa de la síntesis de proteínas para recuperar a la población de receptores (revisado por Lohse, 1993). El receptor para trombina es un ejemplo particularmente interesante. En este caso, el receptor es cortado proteolíticamente por la enzima durante el proceso de activación, luego dichos receptores son internalizados hasta compartimentos lisosomales, mientras que la membrana plasmática se nutre de nuevos receptores que estaban almacenados en el aparato de Golgi (Hein, *et al*, 1994).

**d) Regulación a nivel de las proteínas G.**

La activación de los receptores acoplados a proteínas G puede resultar en una redistribución de éstas hacia vesículas en el citosol (Svoboda, y Milligan, 1994) o en una disminución neta en el contenido de las mismas. Este proceso ha sido detectado en miembros de las familias Gs, Gi y Gq. En general, el proceso mencionado está determinado por los niveles de expresión de los receptores participantes y generalmente se restringe a las proteínas G a las que éstos se acoplan. La reducción en el contenido

celular de proteínas G, inducida por algún agonista, se considera parte de un mecanismo de adaptación para la desensibilización prolongada (Milligan, 1993; Wise, *et al*, 1995)

Las concentraciones celulares de las proteínas G<sub>q</sub> y G<sub>11</sub>, involucradas en la regulación del recambio de fosfoinosítidos, están sujetas a regulación como resultado de la estimulación constante de receptores acoplados a este sistema; esto ocurre, por ejemplo, en células CHO transfectadas con receptores muscarínicos m1 en donde una activación constante de estos receptores provoca una disminución tanto de los receptores como de las proteínas G mencionadas, de acuerdo a una cinética similar y dependiente de la concentración del agonista empleado (Mullaney, *et al*, 1993). Puesto que algunos receptores aparentemente pueden compartir las reservas endógenas de proteínas G, el estímulo crónico de algunos de ellos puede, por ende, regular la respuesta resultante de estimular a otro del mismo grupo, ocurriendo así desensibilización heteróloga. En experimentos de unión de ligandos radiactivos a membranas de hepatocitos, Dasso y Taylor demostraron que la vasopresina disminuye la unión de alta afinidad de la epinefrina a los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, probablemente porque captura a las proteínas G necesarias para dar la conformación de alta afinidad de los receptores adrenérgicos referidos (Dasso, y Taylor, 1992).

Por otro lado, la actividad de las proteínas G puede ser regulada por fosforilación; algunos ejemplos de regulación cruzada sugieren lo anterior. La fosforilación de la G $\alpha_2$  por la PKC, atenúa su acción sobre la adenilil ciclasa (Strassheim y Malbon, 1994). Las proteínas G $\alpha_{12}$  y G $\alpha_z$  también pueden ser fosforiladas por la PKC. En este caso el efecto obtenido es una disminución en su capacidad de interacción con el dímero  $\beta\gamma$  (Kozasa, y Gilman, 1996).

#### **e) Regulación por disponibilidad del sustrato.**

Las señales inductoras de la adenilil ciclasa difícilmente pueden sufrir de carencia de

sustrato ya que en cualquier célula normal las concentraciones citosólicas de ATP generalmente no son limitantes. Por otro lado, la vía de señales que requiere del recambio de fosfoinosítidos sí puede estar limitada por la disponibilidad de lípidos de inositol, puesto que la concentración de fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato, que es el sustrato de la PLC, constituye menos del 5% de los fosfoinosítidos presentes en la membrana celular (Alberts, *et al.*, 1994). Además, la depleción de los reservorios intracelulares de calcio, por la activación de un receptor acoplado al sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, puede bloquear la respuesta de otro receptor acoplado a la misma vía de transducción; por ejemplo, la activación de los receptores muscarínicos en las células SH-SY5Y impide la subsecuente acción de los receptores para bradicinina (Willars y Nahorski, 1995).

**f) El modelo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico.**

El receptor  $\beta_2$  adrenérgico sufre desensibilización tanto homóloga como heteróloga. Este receptor, acoplado a proteína Gs, estimula a la adenilil ciclasa incrementando el AMP cíclico intracelular y activando a la PKA. La acción de este receptor se encuentra cuidadosamente modulada por la célula, su estudio detallado ha servido como modelo para comprender el proceso de desensibilización en otros receptores acoplados a proteínas G. El panorama actual sugiere que la desensibilización homóloga esta controlada por la fosforilación del receptor por parte de una cinasa específica de éste (la mencionada  $\beta$ ark-1 o GRK-2), desacoplándolo del sistema de transducción (Benovic, *et al.*, 1986), por intervención de proteínas que se unen al receptor fosforilado, estas proteínas son conocidas como arrestinas. Los sitios de fosforilación por  $\beta$ ark-1 en este receptor han sido mapeados en el extremo carboxilo-terminal (Nakata, *et al.*, 1994; Fredericks, Pitcher y Lefkowitz, 1996). Además, el receptor  $\beta_2$  adrenérgico también puede ser fosforilado por la PKC y por la PKA, causando una disminución en su acoplamiento con la proteína Gs (Pitcher, *et al.*, 1992) Posteriormente, el receptor ocupado por su agonista, es internalizado, creando con ello una barrera física entre el agonista y el receptor (Pippig, Andexinger y Lohse, 1995). La internalización de este receptor ocurre



en vesículas de clatrina y requiere la actividad de GTPasa de la dinamina (Moore, *et al*, 1995; Zhang, *et al*, 1996). Por último, el receptor es sustrato para la acción de una fosfatasa y luego es reciclado a la membrana plasmática, para reiniciar un nuevo ciclo de activación. A nivel post-transcripcional, el RNA mensajero del receptor adrenérgico  $\beta_2$  es regulado por la unión de la proteína  $\beta$ -ARB, misma que aparentemente lleva al mensajero a perder su estabilidad (Tholanikunnel, Granneman y Malbon, 1995).

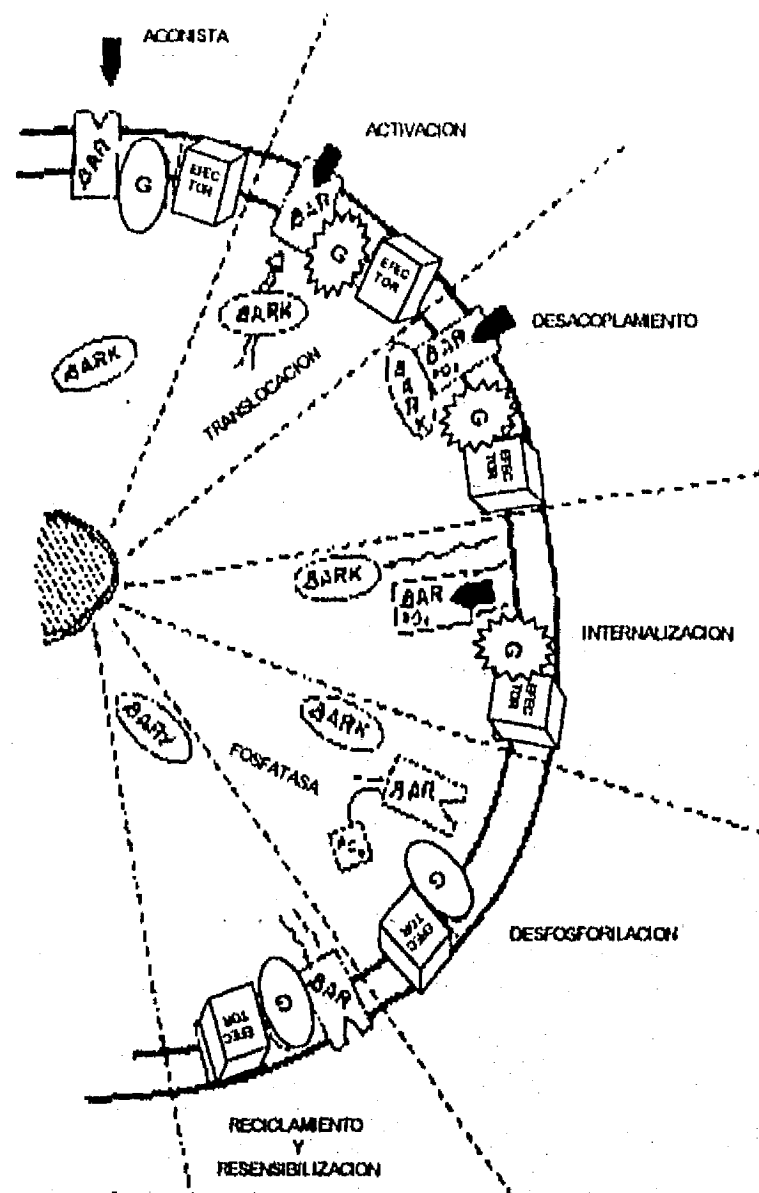


Figura No. 4. Modelo de regulación del receptor  $\beta_2$  adrenérgico. La descripción del proceso se encuentra en el texto. Figura modificada de Sibley *et al*, 1987.

## X. RECEPTORES ADRENÉRGICOS.

Cien años han transcurrido desde que Oliver y Schäfer descubrieron que extractos crudos de médula adrenal ejercen efectos fisiológicos en el sistema cardiovascular y en el músculo esquelético (revisado por García-Sáinz, 1995). Siguió a este hallazgo la purificación del principio activo que inicialmente fue llamado epinefrina por John J Abel

y más tarde adrenalina por Jokichi Takamine. Hasta la fecha, ambos nombres son empleados cotidianamente para referirse a la misma hormona. Desde entonces, miles de investigadores alrededor del mundo han contribuido a entender el mecanismo de acción

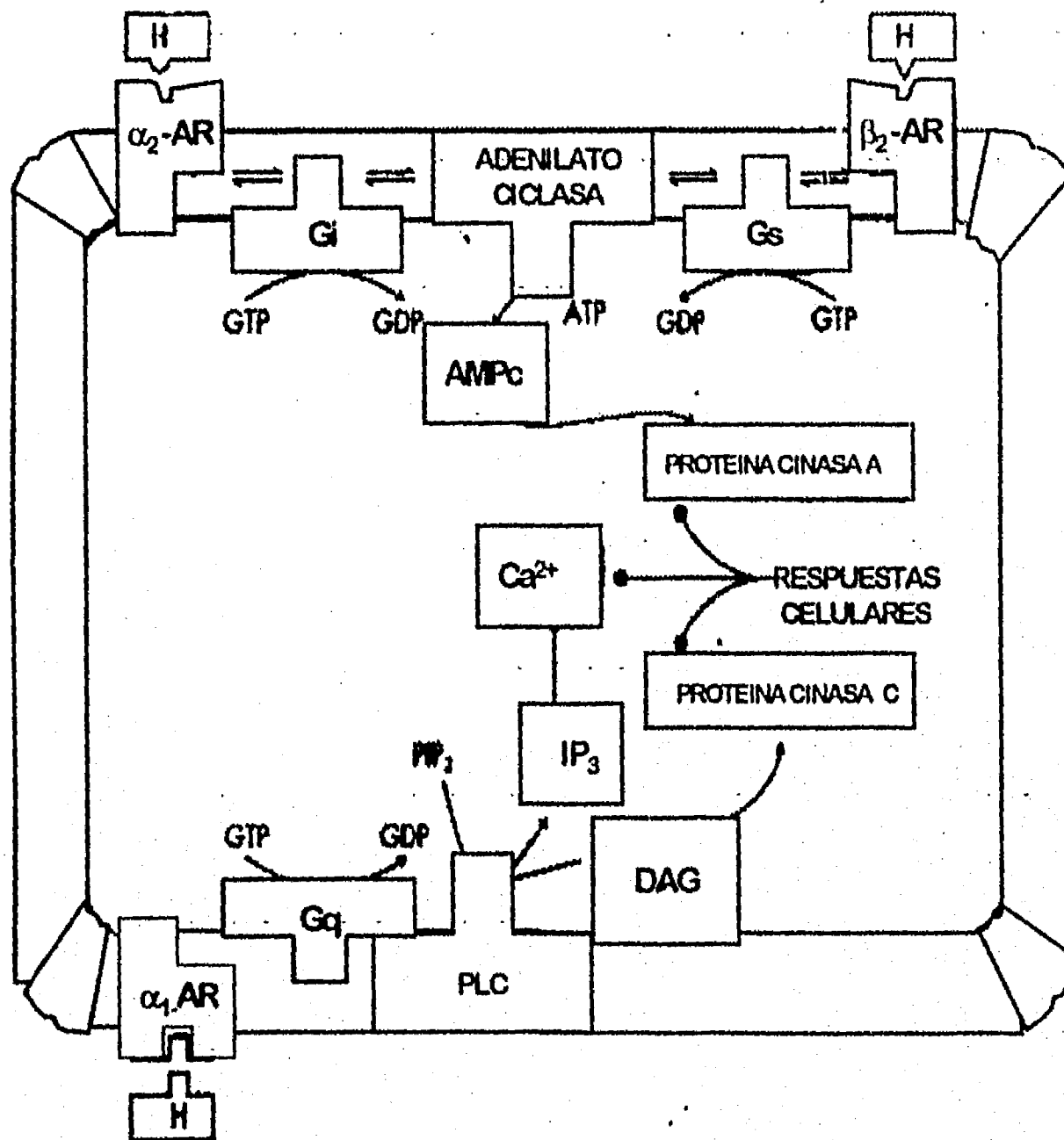


Figura No. 5. Vías de transducción de los receptores adrenérgicos. Los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos ( $\alpha_1$ -AR) se acoplan a una proteína  $G_q$ , estimulan a la fosfolipasa C $\beta$  (PLC), generando diacil-glicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ), mismos que conducen a la movilización de calcio intracelular y a la activación de la proteína cinasa C. Los receptores  $\beta$  adrenérgicos ( $\beta$ -AR) se acoplan a una proteína  $G_s$  que estimula a la adenilato ciclasa, generando adenosin monofosfato cíclico (AMPc) que activa a la proteína cinasa A. Los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos se acoplan a una proteína  $G_i$  e inhiben a la adenilato ciclasa.

y los procesos en los que esta hormona está involucrada. Entre las acciones celulares más relevantes que han sido descritas, se incluyen efectos rápidos como modulación del tono vascular y activación metabólica; así como respuestas duraderas que derivan de la expresión de genes y que pueden llevar incluso a la hipertrofia celular y probablemente a la proliferación (Rokosh, *et al*, 1996; García-Sáinz y Alcántara-Hernández, 1996; Allen, *et al*, 1991; González-Espinosa y García-Sáinz, 1992, Chen, *et al*, 1995; Thonberg, *et al*, 1994 y Milano, *et al* 1994). Particularmente, la acción aparentemente contradictoria, de inhibir o estimular la contracción de diferentes tejidos musculares, como respuesta a la presencia de adrenalina, llevó a Alhquist, en 1948, a proponer la existencia de dos subtipos de receptores adrenérgicos que llamó  $\beta$  y  $\alpha$ . Años después se sugirió heterogeneidad en el grupo de receptores  $\alpha$ , debido, particularmente, a su influencia en la liberación de neurotransmisores. Así, fueron subdivididos en  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . Actualmente sabemos que el grupo de receptores adrenérgicos está constituido por tres familias, de tres miembros cada una, y que tanto los receptores  $\beta$  adrenérgicos como los  $\alpha_2$  modulan la actividad de la adenilil ciclasa; los primeros la estimulan a través de la activación de una proteína Gs y los segundos la inhiben gracias a su acoplamiento con la proteína Gi. Por su parte, la familia  $\alpha_1$  regula la concentración citosólica de calcio y activa a la proteína cinasa C, estos efectos están mediados por la activación de una proteína G de la familia Gq (Figura No.5). Además de los sistemas de transducción antes mencionados, que son los que se consideran "clásicos" y se activan en todos los tipos celulares en los que los receptores adrenérgicos están presentes, existen efectos que son particulares de diferentes tipos celulares; por ejemplo, la activación de la fosfolipasa A2 en células transfectadas (Pérez, de Young y Graham, 1993); estímulo mitogénico en células de músculo liso vascular, mismo que resulta de la activación de la cinasa que fosforila al fosfatidil-inositol(4,5)bisfosfato en la posición 3 y parece estar mediado por una proteína Gi, sensible a la toxina pertussis (Hu, *et al*, 1996) y control de la apertura de canales iónicos tales como los canales de calcio tipo L, en miocitos de vena porta de rata (LePrete, Mironneau y Morel, 1994).

Desde luego es un misterio la razón de la existencia de tantos subtipos de receptores adrenérgicos, capaces de estimular a diferentes sistemas de transducción, y que pueden encontrarse coexpresados en diferentes tipos celulares. Sin embargo, evidentemente la célula requiere e integra las acciones de los distintos subtipos adrenérgicos. Suponemos que la respuesta final depende, entre otras cosas, de la regulación a que estos sean sujetos, particularmente la sensibilidad al bloqueo de la respuesta ante un estímulo pronunciado o permanente y la regulación cruzada entre distintos subtipos y con otros receptores para otras señales que seguramente en un momento dado, la célula recibe simultáneamente. Este es un campo de estudio abierto a la exploración, los resultados recientes sugieren que cada familia de receptores adrenérgicos incluye subtipos que sufren desensibilización de manera particular, y que se acoplan con diferente grado de eficacia a los sistemas de transducción que estimulan; mucho de este conocimiento se ha generado gracias a la clonación de los genes de estos receptores y su expresión, por transfección, en sistemas modelo. Esto ha permitido la introducción de secuencias modificadas de los receptores y ha ayudado a conocer los sitios de interacción con el ligando, las secuencias importantes para el acoplamiento de las proteínas G, aquellas que regulan la internalización de los receptores y los dominios que intervienen en la fosforilación que lleva a la desensibilización de los mismos. Tanta heterogeneidad ha abierto expectativas para el estudio de antagonistas específicos, potenciales agentes terapéuticos, útiles en el tratamiento de padecimientos generados o influenciados por desórdenes en la actividad de los receptores adrenérgicos (Milligan, Svoboda y Brown, 1994).

Las catecolaminas que actúan a través de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos estimulan el recambio de fosfoinosítidos. El inositol trisfosfato y el diacilglicerol, generados por la activación de estos receptores, llevan a la movilización del calcio intracelular y a la activación de la proteína cinasa C, generando a continuación diversas respuestas celulares que incluyen contracción, secreción y activación metabólica dependiendo del tipo celular. La familia de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos está comprendida por tres

subtipos diferentes ( $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$ ). Estos han sido clonados y expresados por transfección en diversos sistemas modelo de células en cultivo, en los que todos ellos estimulan el recambio de fosfoinosítidos (Cotecchia, *et al*, 1988; Schwinn, *et al*, 1990; Lomasney, *et al*, 1991; Pérez, Piascik y Graham, 1991; Minneman, y Esbenshade, 1994; García-Sáinz, 1993). La existencia de varios subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos que modulan a la misma vía de transducción, sugiere la existencia de particularidades en su regulación, tal como ha sido descrito para los adrenoreceptores que pertenecen a las familias  $\beta$  y  $\alpha_2$  (Nantel, *et al*, 1993; Kurose, y Lefkowitz, 1994).

#### XI. REGULACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha_{1B}$ ADRENÉRGICO.

Los receptores adrenérgicos, pertenecientes al subtipo  $\alpha_{1B}$ , son sensibles a la activación de la proteína cinasa C, en células que los expresan naturalmente. En hepatocitos aislados de rata, se demostró que la glucogenolisis, inducida por estímulo adrenérgico, es bloqueada fuertemente por los ésteres de forbol; en tanto que la acción de otras hormonas acopladas al mismo sistema de transducción no fue igualmente afectada, sugiriendo especificidad en la acción de los ésteres de forbol, hacía el receptor  $\alpha_1$  adrenérgico. (Corvera y García-Sáinz, 1984; Corvera, *et al* 1986). La acción inhibitoria de los ésteres de forbol sobre otras acciones mediadas por activación del receptor  $\alpha_1$  adrenérgico en hepatocitos de rata fue confirmada por otros autores (Lynch, *et al*, 1985; Cooper, *et al*, 1985). Hallazgos equivalentes se detectaron en estudios de la línea celular DDT<sub>1</sub>-MF2, originada de músculo liso de hamster, en la que además se demostró la fosforilación del receptor (Leeb-Lundberg, *et al* 1985 y 1987).

Estudios recientes, realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que hepatocitos de distintas especies expresan subtipos diferentes de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos (García-Sáinz, *et al*, 1992), esto ha permitido su empleo como modelo de estudio comparativo entre un mismo tipo celular que expresa naturalmente los diferentes subtipos de estos receptores. Así, la comparación de la respuesta adrenérgica y la

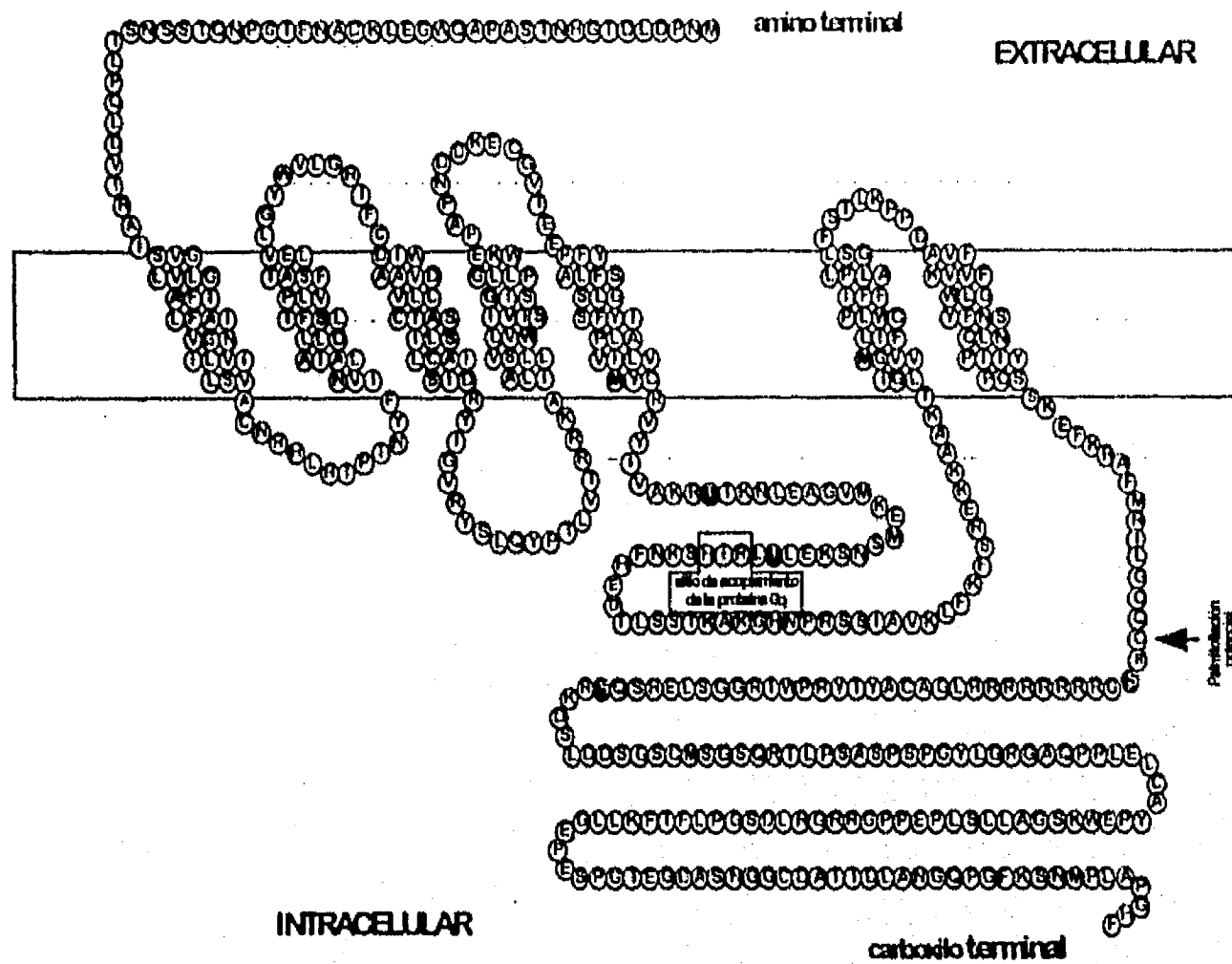


Figura No. 8. Modelo del receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$ . Esquema de la estructura del receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$  clonado de la línea celular DDT1MF2 proveniente de hamster (Cotecchia, *et al*, 1988). Los aminoácidos que corresponden a sitios consenso para fosforilación por la PKC se indican con círculos negros. En el extremo carboxilo-terminal se indica con una flecha la cisteína a la que potencialmente se le une un palmitato, formando una cuarta asa intracelular. El sitio de acoplamiento para la proteína Gq ha sido ubicado, por mutagénesis dirigida, en la tercera asa intracelular (Dianing, Huiping y Simon, 1995).

regulación de ésta en hepatocitos de conejo y rata (que expresan los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$  respectivamente) ha mostrado propiedades características y una sensibilidad diferencial al bloqueo por ésteres de forbol, encontrándose mayor resistencia al bloqueo por activación directa de la PKC en hepatocitos de conejo y mayor sensibilidad en los de rata para la desensibilización inducida por ésteres de forbol (García-Sáinz, y Macías-Silva, 1995).

El dominio responsable de la desensibilización homóloga del receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico

ha sido mapeado en el extremo carboxilo terminal de éste (Figura No. 8). Experimentos con células transfectadas, en los que se induce la expresión de una forma truncada del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, mostraron que la carencia del extremo carboxilo-terminal no afecta el acoplamiento del receptor con el sistema de recambio de fosfoinosítidos, típico del receptor silvestre. Sin embargo, resulta incapaz de sufrir fosforilación ante un estímulo homólogo o heterólogo, éste último entendido como un tratamiento agudo con PMA (Lattion, Diviani y Cotecchia, 1994). La coexpresión de las  $\beta$ -arrestinas 1 ó 2, que atenúa la respuesta del receptor íntegro, no tiene influencia alguna sobre el truncado (Diviani, *et al*, 1996). Si bien estos hallazgos sugieren que los aminoácidos blanco de la fosforilación podrían estar localizados en el extremo carboxilo-terminal del receptor, no se descarta que este dominio sea indispensable para la interacción de proteínas reguladoras, incluidas cinasas, que pudieran fosforilar al receptor en otros sitios y que, por lo tanto, la ausencia de fosforilación en el receptor truncado pudiera ser debida, más que a la ausencia de sitios blanco para la fosforilación, a la incapacidad de este receptor para reclutar hacia la membrana a las cinasas responsables del evento. Por otro lado, la intervención de la PKC ha sido considerada como necesaria para permitir la adecuada internalización del receptor, como parte del proceso de desensibilización en una etapa que podríamos considerar tardía, ya que ocurre en cuestión de minutos (Fonseca, Button y Brown, 1995; Zhu, *et al*, 1996), mientras que el bloqueo de la acción hormonal puede ocurrir en cuestión de segundos. Resulta conveniente señalar que el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico truncado sufre deficiencia en el proceso de internalización (Lattion, Diviani y Cotecchia, 1994), lo que haría pensar que el dominio carboxilo-terminal podría también ser blanco de la actividad de la PKC. Por otro lado, la exposición prolongada a norepinefrina conduce a una disminución en el contenido celular tanto de los receptores  $\alpha_{1b}$  adrenérgicos como del RNA mensajero que codifica para ellos, en fibroblastos Rat-1 transfectados y en células de músculo liso vascular, respectivamente (Wise, *et al*, 1995; Izzo, *et al*, 1994). Los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos se coexpresan en cultivos de miocitos cardíacos de rata neonatal. En estas células, la exposición prolongada a norepinefrina induce hipertrofia. Recientemente se demostró que en ellas,

los niveles de RNAm de los subtipos  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1B}$  disminuyen en las circunstancias mencionadas; por otro lado, el RNAm del subtipo  $\alpha_{1C}$  (que actualmente corresponde al  $\alpha_{1A}$ ) aumenta. Este mismo efecto se observó con otros agentes hipertróficos tales como ésteres de forbol y endotelina-1. Estos resultados proveen un ejemplo claro de que los subtipos  $\alpha_1$  adrenérgicos, coexpresados naturalmente en un mismo tipo celular, están sujetos a regulación diferencial. Resulta interesante destacar que la respuesta adrenérgica  $\alpha_1$  no sufre desensibilización en los miocitos cardiacos, quizá la clave de este comportamiento radique en el aumento del receptor  $\alpha_{1C}$  (Rokosh, *et al*, 1996). Por otro lado, en células de músculo liso vascular, la disminución del RNAm del receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico, por estimulación crónica con su agonista, es mediado por la activación de la PKC (Izzo, Tulenko y Colucci, 1994).

La cotransfección de la GRK2 con el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico ha mostrado influencia positiva en el proceso de desensibilización homóloga, la especificidad del sistema permanece por ser demostrada ya que un efecto similar se detectó con la coexpresión de la GRK3 y la GRK6, en tanto que la GRK5 condujo a un incremento de la fosforilación basal del receptor que ya no pudo ser incrementada por la acción del agonista. Un hallazgo interesante, que cabe destacar, es que la coexpresión de una forma catalíticamente inactiva y dominante de la GRK2 bloquea la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, inducida por el agonista (Diviani, *et al*, 1996). La fosforilación del receptor adrenérgico  $\alpha_{1b}$ , inducida por coexpresión de GRK5 y GRK6, no tiene efecto negativo en la producción de fosfatos de inositol ante un estímulo adrenérgico. En experimentos similares, la presencia de GRK2 o GRK3 sí contribuyó al bloqueo en la producción de los fosfatos de inositol. En vista de que la coexpresión de cada una de las cuatro cinasas mencionadas da lugar a un incremento en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, la falta de correlación con el bloqueo en la producción de fosfatos de inositol podría ser interpretada como un efecto diferencial de la fosforilación por distintas cinasas; habiendo quizá, diferencias en los sitios blanco de la fosforilación, que a su vez modificarían diferencialmente la habilidad de los receptores para interaccionar con las proteínas



responsables de bloquear la vía de transducción. Entre estas podrían citarse a las  $\beta$ -arrestinas cuya coexpresión con GRKs 2 y 3 incrementa el bloqueo del estímulo adrenérgico sobre el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, en tanto que no surte ningún efecto en presencia de GRKs 5 y 6 (Diviani, *et al*, 1996).

## **XII. OBJETIVOS.**

La presente tesis se dedicó al estudio del proceso de activación y desensibilización de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$ , transfectados en clonas independientes de fibroblastos Rat-1. Además, se determinó la fosforilación del subtipo  $\alpha_{1b}$  ante un estímulo adrenérgico, ante la activación de la PKC con PMA y ante la activación de receptores para endotelina presentes endogenamente en los fibroblastos Rat-1.

1. - Se investigó el efecto del estímulo adrenérgico en cada uno de los subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, sobre la activación de la vía de fosfoinosítidos-calcio. Para ello se cuantificó la producción de  $^3\text{H}$ -inositol-trisfosfato y la movilización de calcio intracelular.
- 2.- Se evaluó la influencia de la activación directa de la PKC, mediante la exposición a ésteres de forbol, en la actividad de cada uno de los subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos.
- 3.- Se determinó la desensibilización homóloga de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, tomando como parámetro la movilización de calcio intracelular.
- 4.- Se investigó el papel de la PKC en la desensibilización homóloga de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos. Para ello se evaluó este proceso en células sometidas a tratamiento prolongado con PMA, mismo que induce degradación de las isoformas de PKC sensibles a este agente.

5.- Se estudió la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico en células estimuladas con norepinefrina, endotelina y PMA.

6.- Se determinó el curso temporal y la dependencia de la dosis de los agonistas en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico.

7.- Se investigó el efecto inhibidores de cinasas que fosforilan en residuos de serina y treonina y de aquellas que fosforilan en residuos de tirosina, en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, inducida por la activación de los receptores para endotelina.

8.- Se evaluó el efecto de la depleción de la PKC, por tratamiento prolongado con PMA, en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico.

9.- Se determinó la participación de alguna proteína G, sensible a la toxina pertussis, en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico.

10.- Se evaluó la posible participación de los receptores para factor de crecimiento epidérmico en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico.

La metodología empleada y los resultados, que se resumen a continuación, se presentan en los siguientes trabajos:

1. "Effect of Phorbol Myristate Acetate on  $\alpha_1$ -Adrenergic Action in Cells Expressing Recombinant  $\alpha_1$ -Adrenoceptor Subtypes". Autores: Vázquez-Prado y García Sáinz. Publicado en *Molecular Pharmacology*, 1996; 50:17-22.

2. "Endothelin induces phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor Transfected to Rat-1 fibroblasts. Comparison with the effect of Norepinephrine". Autores: Vázquez-Prado,

Bañuelos y García-Sáinz. Manuscrito enviado a publicación.

### XIII. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis, así como las metodologías empleadas para su obtención, se presentan en dos artículos que se incluyen en la sección de resultados y que se resumen a continuación:

#### Resumen de resultados

##### Primer trabajo:

"Effect of Phorbol Myristate Acetate on  $\alpha_1$ -Adrenergic Action in Cells Expressing Recombinant  $\alpha_1$ -Adrenoceptor Subtypes". Autores: Vázquez-Prado y García Sáinz. Publicado en Molecular Pharmacology, 1996; 50:17-22.

##### a) Validación del modelo:

Se emplearon tres líneas celulares de fibroblastos Rat-1, cada una de ellas transfectada con un subtipo distinto de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos hasta ahora conocidos ( $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$ ). Las células modelo expresaron niveles similares de los subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos y una afinidad similar por el ligando:  $\alpha_{1a}$ ,  $B_{max}$ :1.04 pmol/mg de proteína membranal,  $K_D$ :0.36 nM;  $\alpha_{1b}$ ,  $B_{max}$ :2.04 pmol/mg de proteína membranal,  $K_D$ :0.3 nM;  $\alpha_{1d}$ ,  $B_{max}$ :0.79 pmol/mg de proteína membranal,  $K_D$ :0.29 nM. (Fig.1, pag 51).

Se verificó que cada clona expresara el subtipo indicado de receptor  $\alpha_1$  adrenérgico por hibridación del RNAm total con sondas específicas para cada uno (Fig 2, pag 52).

**b) Transducción de señal:**

Los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos estimularon la movilización del calcio intracelular y la producción de inositol-trisfosfato ante la presencia de norepinefrina. El subtipo  $\alpha_{1a}$  desencadenó una respuesta más intensa que el  $\alpha_{1b}$  y ambos que el  $\alpha_{1d}$  (Figs. 3 y 4, pag 52).

**c) Desensibilización heteróloga:**

La activación de la PKC con forbol miristato acetato provocó un bloqueo diferencial de la respuesta adrenérgica activada por los distintos subtipos de receptores. El subtipo  $\alpha_{1d}$  fue el más sensible, seguido del  $\alpha_{1b}$ ; el subtipo  $\alpha_{1a}$  fue resistente a la acción de la PKC (Fig. 5, pag 52 y Fig. 6, pag 53). Este efecto se eliminó por tratamiento crónico de las células con el éster de forbol (Fig.7, pag 53).

**d) Desensibilización homóloga:**

La movilización del calcio intracelular, ante la presencia de concentraciones crecientes de norepinefrina, reflejó que los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos siguen un proceso de desensibilización homóloga similar. La principal diferencia detectada, fue que la activación del subtipo  $\alpha_{1a}$  impidió que la subsecuente estimulación de receptores para endotelina, presentes en los fibroblastos estudiados, condujera a movilización del calcio intracelular, a diferencia de los otros dos subtipos que sí lo permitieron (Fig. 8, pag 53).

**Segundo trabajo:**

"Endothelin induces phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor Transfected to Rat-1 fibroblasts. Comparison with the effect of Norepinephrine". Autores: Vázquez-Prado, Bañuelos y García-Sáinz. Manuscrito enviado a publicación.

**e) Fotomarcaje e inmunoprecipitación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico:**

El receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico fue detectado, en membranas de los fibroblastos transfectados con este subtipo, por marcaje con un antagonista radiactivo que se une

covalentemente al receptor cuando es activado por exposición a luz ultravioleta,. Además, fue inmunoprecipitado específicamente con un anticuerpo que se generó contra un decapeptido con la secuencia carboxilo-terminal de este receptor (Fig. 1, pag 69).

**f) Fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico:**

**f.1) Efecto de norepinefrina y endotelina.** La activación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico con norepinefrina, o bien la activación del receptor para endotelina, endógeno en los fibroblastos Rat-1, condujo a un incremento en la fosforilación del primero, dependiente de la dosis del agonista utilizado. El efecto de la endotelina fue bloqueado con el antagonista BQ-123, específico para el subtipo  $ET_A$  de estos receptores (Fig 2, pag 70).

**f.2) Curso temporal.** La estimulación de los receptores para endotelina propició un incremento en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico en una forma más rápida e intensa que la unión de su propio agonista (Fig 3, pag, 71).

**f.3) Efecto de la genisteína y de la estaurosporina.** La fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, inducida por la estimulación de los receptores para endotelina, requiere de la participación de cinasas con especificidad por residuos de serina/treonina (inhibibles con estaurosporina) y de cinasas que fosforilan residuos de tirosina (sensibles a genisteína) (Fig 4, pag 72).

**f.4) Efecto del tratamiento crónico con ésteres de forbol.** El tratamiento crónico con ésteres de forbol condujo a un incremento en la fosforilación basal del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, mismo que ya no pudo ser incrementado por ningún estímulo (Fig 5, pag 73).

**f.5) Efecto de la toxina pertussis.** La fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, inducida por norepinefrina, endotelina o ésteres de forbol, resultó independiente de la actividad de proteínas G sensibles a la toxina pertussis (Fig 6, pag 74).

**f.6) Efecto del factor de crecimiento epidérmico.** La activación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico no incrementa significativamente la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico (Fig 7, pag 75).

0026-895X/96/010017-06\$3.00/0  
 Copyright © by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics  
 All rights of reproduction in any form reserved.  
 MOLECULAR PHARMACOLOGY, 50(1):17-22 (1996)

## Effect of Phorbol Myristate Acetate on $\alpha_1$ -Adrenergic Action in Cells Expressing Recombinant $\alpha_1$ -Adrenoceptor Subtypes

JOSÉ VÁZQUEZ-PRADO and J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ

Departamento de Bioenergética y Biomembranas, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 04510

Received November 9, 1995; Accepted March 16, 1996

### SUMMARY

We studied the ability of norepinephrine to stimulate [ $^3$ H]inositol trisphosphate production and calcium mobilization in rat-1 fibroblasts stably expressing the cloned  $\alpha_1$ -adrenergic subtypes and their sensitivity to phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). It was observed that the three subtypes were able to activate this signal transduction process, but marked differences in efficacy were noted. The order of efficacy was  $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} > \alpha_{1d}$  in cells with similar receptor densities. The use of PMA blocked the  $\alpha_{1d}$  responses at lower concentrations than those needed to block the  $\alpha_{1b}$  action; little effect of PMA was observed on

effects mediated through  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptors. These effects of PMA were not observed in cells preincubated overnight with the tumor promoter, suggesting that such actions were mediated through isoform or isoforms of protein kinase C subjected to down-regulation. The repetitive addition of norepinephrine induced desensitization of the  $\alpha_1$ -adrenergic action in cells expressing any of the three subtypes, and this effect was not altered by overnight pretreatment with PMA. Our data indicate that there are differences in sensitivity to PMA among the  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes stably expressed in rat-1 fibroblasts.

Three distinct  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes have been cloned (1-4). As recommended by the International Union of Pharmacology Committee for Receptor Nomenclature and Drug Classification (5), they are referred to as  $\alpha_{1a}$ - (1),  $\alpha_{1b}$ - (2), and  $\alpha_{1d}$ - (3, 4) adrenergic receptors. All of these subtypes seem to be primarily coupled to the hydrolysis of phosphoinositides (6-9) via G proteins of the  $G_q/G_{11}$  family (9), with subsequent stimulation of phospholipase C $\beta$  activity. They can also couple to other signal transduction pathways (6, 8), but this varies among cell types (8). The existence of several receptor subtypes that modulate the same transduction pathways suggests the possibility that differences may exist in their regulation. Different regulatory properties have been described for members of the  $\beta$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor families (10, 11).

Activation of protein kinase C with active phorbol esters, such as PMA, blocks  $\alpha_1$ -adrenergic actions (12-19), which is associated with receptor phosphorylation (14). This action of protein kinase C seems to be physiologically relevant in homologous and heterologous desensitization of the  $\alpha_1$ -adrenergic action (15-17). However, other protein kinases also participate in these processes (18, 19).

Most of the studies on protein kinase C-mediated blockade

and/or desensitization of the  $\alpha_1$ -adrenergic action have been carried out in cells that either express naturally the  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor [e.g., rat hepatocytes (20) or DDT $_1$  MF-2 cells (2, 14, 17)] or have been transfected with this receptor subtype. This raises the possibility that different subtypes may have distinct sensitivities to the action of this protein kinase. We observed that hepatocytes obtained from different species express different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes (20) and that such receptor subtypes vary in their sensitivity to phorbol esters (21). However, the observed differences in sensitivity could be due not only to the receptor subtype expressed by the cells but also to other differences in the molecular repertoires expressed in the distinct hepatocytes. Therefore, comparison of the receptor subtype sensitivity to PMA in the same cell type seems to be required to reveal intrinsic differences among these adrenoceptors. To the best of our knowledge, no such comparison has been reported. We characterized  $\alpha_1$ -adrenergic responses (increase in [ $Ca^{2+}$ ] $_i$  and [ $^3$ H]InsP $_3$  production) with the use of fibroblasts transfected with the different cloned  $\alpha_1$ -adrenergic subtypes and their sensitivity to PMA. Our results suggest that distinct subtypes have different sensitivities to protein kinase C activation.

### Experimental Procedures

**Materials.** (-)-Norepinephrine, endothelin, PMA, and ( $\pm$ )-prazosin were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

This work was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (4711-N9406) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN 200193). J.V.-P. is sponsored by a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

**ABBREVIATIONS:** [ $Ca^{2+}$ ] $_i$ , intracellular calcium concentration; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; InsP $_3$ , inositol phosphate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; SDS, sodium dodecyl sulfate; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

Fura-2/AM was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Phentolamine was a generous gift from Ciba-Geigy (Summit, NJ). DMEM, fetal bovine serum, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from GIBCO BRL (Gaithersburg, MD). [<sup>3</sup>H]Prazosin (74.4 Ci/mmol) and myo-[2-<sup>3</sup>H]inositol (22.9 Ci/mmol) were from New England Nuclear (Boston, MA).

**Stably transfected cell lines.** Rat-1 fibroblasts clones stably expressing one of the different cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptors ( $\alpha_{1a}$ , cloned from bovine brain (1);  $\alpha_{1b}$ , cloned from DDT, MF-2 cells (2); and  $\alpha_{1d}$ , cloned from rat brain (3)) were kindly provided by Drs. L. Allen, R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron (Duke University, Departments of Medicine and Cardiology, Durham, NC). Transfected rat-1 fibroblasts were grown in glutamine-containing high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, and 0.25  $\mu$ g/ml amphotericin B at 37° under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For selection, cells were cultured in the presence of the neomycin analogue G-418 sulfate (300  $\mu$ g/ml).

**Northern blot analysis.** Expression of the mRNA for the transfected  $\alpha_1$ -adrenoceptors was evaluated with Northern blot analysis. Total RNA (40  $\mu$ g) obtained according to the method of Chomczynski and Sacchi (22) was electrophoresed in 1.5% agarose gels containing 0.6 M formaldehyde and transferred to Hybond-N membranes (Amersham) according to standard procedures. Hybridization was done under high stringency conditions with nick-translated probes (23). In brief, membrane filters were prehybridized for 4 hr at 55° in a solution containing 35% formamide, 10% dextran sulfate, 5 $\times$  Denhardt's reagent (1 $\times$  = 0.02% Ficoll, 0.02% bovine serum albumin, 0.02% polyvinylpyrrolidone), 5 $\times$  SSPE (1 $\times$  = 0.15 M NaCl, 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001 M EDTA, pH 7.4), 1% SDS, and 500  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA. The probes used were an 812-bp *Bgl*III fragment of the bovine  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptor cDNA (1), an 803-bp *Eco*RI/*Bam*HI fragment of the hamster  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptor cDNA (2), and an 850-bp *Bam*HI fragment of the rat  $\alpha_{1d}$ -adrenoceptor cDNA (3). Hybridization lasted 16–20 hr at 55°. The membranes were washed twice for 15 min in 0.2 $\times$  standard saline citrate (1 $\times$  = 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0)/0.2% SDS at 55° and twice for 15 min in 0.1 $\times$  standard saline citrate/0.1% SDS at 55°. The membranes were exposed to X-ray film at -70° with one intensifying screen.

**Membrane preparation and [<sup>3</sup>H]prazosin binding.** Confluent transfected rat-1 fibroblasts cultured in 10-cm Petri dishes were scraped with a rubber policeman and pelleted through centrifugation. Membrane preparation was performed according to Mattingly *et al.* (24). Protein concentration was determined according to the method of Lowry *et al.* (25) with bovine serum albumin as standard. [<sup>3</sup>H]Prazosin saturation isotherms were performed by incubating the radioligand with the membranes (25  $\mu$ g of protein) in a final volume of 0.25 ml of buffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5) for 60 min at 25° in a shaking water bath. Incubation was terminated by the addition of 5 ml of ice-cold buffer and filtration through GF/C filters with a Brandel harvester. Filters were washed twice and dried, and radioactivity was measured with a liquid scintillation counter. Non-specific binding was determined in the presence of 10  $\mu$ M phentolamine. Saturation curves were analyzed by the EBDA program (Bio-soft-Elsevier, Cambridge, UK).

**[<sup>3</sup>H]InsP<sub>3</sub> production.** Cells approaching confluence on 35-mm plates were labeled with [<sup>3</sup>H]inositol (6  $\mu$ Ci/ml) for 18–24 hr in 1 ml of inositol-free DMEM containing 1% fetal bovine serum. On the day of the experiment, cells were washed twice with Krebs-Ringer-HEPES buffer (1 $\times$  = 120 mM NaCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 4.75 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, and 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4) containing 1.3 mM CaCl<sub>2</sub> and preincubated for 20 min in 2 ml of the same buffer containing 10 mM LiCl at 37° in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Incubations with norepinephrine and/or PMA were done for 15 min and were terminated by the addition of 0.4 ml of 30% ice-cold perchloric acid; plates were stored at -20° until the next day. Supernatants of thawed plates were neutralized, and [<sup>3</sup>H]InsP<sub>3</sub> (InsP<sub>1</sub>, InsP<sub>2</sub>, and InsP<sub>3</sub>) were separated through Dowex AG1-X8 chromatography (26). [<sup>3</sup>H]InsP<sub>3</sub> production is presented.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> measurements.** Confluent rat-1 fibroblasts expressing the adrenergic receptors were incubated overnight in G-418-free DMEM containing 1% serum; on the day of the experiment, cells were loaded with 5  $\mu$ M Fura-2/AM in the same medium at 37° for 1 hr. After loading, the cells were washed with Krebs-Ringer-HEPES buffer containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4; scraped from the plate with a rubber policeman; and washed again three times with the use of centrifugation to remove unincorporated dye (in some experiments, the cells were detached with trypsin; identical results were obtained). Cells were resuspended in the same buffer at a concentration of  $\sim 10^6$  cells/ml. Fluorescence measurements were carried out with 2-ml cell suspensions ( $5 \times 10^6$  cells/cuvette) and constant stirring at 37° in an AMINCO-Bowman Series 2 luminescence spectrometer with excitation at 340 nm and emission at 510 nm. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was calculated according to the method of Grynkiewicz *et al.* (27) as described previously (21).

## Results

The expression of the different  $\alpha_1$ -adrenoceptors was studied in the three transfected lines, at both the mRNA and receptor levels. Binding saturation experiments indicate that, as expected, the cells expressed a relatively high level of receptors that was similar in the three cell lines (Fig. 1), although consistently the cell line expressing  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptors had higher values. The density of receptors and their affinities for [<sup>3</sup>H]prazosin in membranes from these cell lines were as follows: (a) cells expressing  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptors,  $B_{max} = 1.04 \pm 0.12$  pmol/mg protein,  $K_D = 0.36 \pm 0.04$  nM; (b) cells expressing  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptors,  $B_{max} = 2.04 \pm 0.47$  pmol/mg protein,  $K_D = 0.30 \pm 0.04$  nM; and (c) cells expressing  $\alpha_{1d}$ -adrenoceptors,  $B_{max} = 0.79 \pm 0.11$  pmol/mg protein,  $K_D = 0.29 \pm 0.03$  nM (results are mean  $\pm$  standard error of six experiments in each case with different membrane preparations). A very strong signal was obtained in the Northern analysis (Fig. 2), which confirmed that each cell line expressed the expected receptor subtype.

Functional parameters were examined. Basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and [<sup>3</sup>H]InsP<sub>3</sub> productions were similar in the three cell lines (see

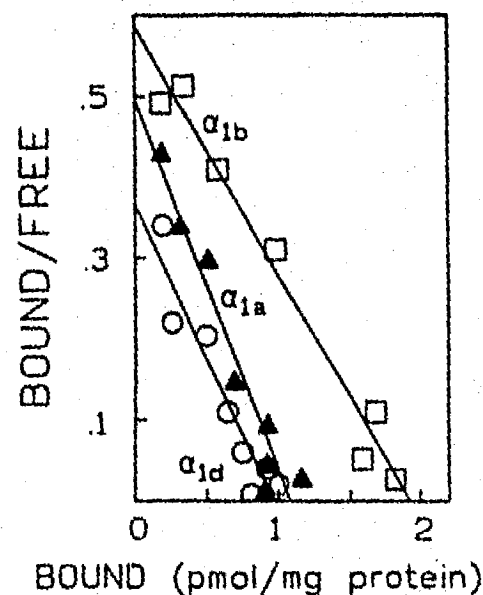


Fig. 1. Rosenthal analysis of saturation isotherms. [<sup>3</sup>H]Prazosin binding to membranes from rat-1 fibroblasts stably expressing  $\alpha_{1a}$ - (▲),  $\alpha_{1b}$ - (□), or  $\alpha_{1d}$ - (○) adrenoceptors was performed as indicated in Experimental Procedures. Data are representative of six experiments with different membrane preparations.



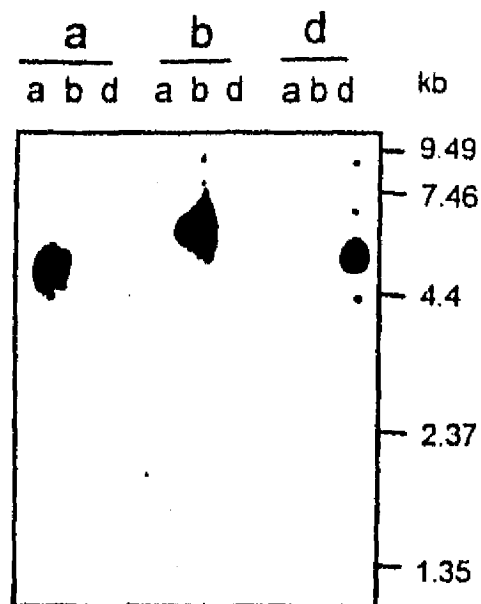


Fig. 2. Northern analysis of RNA obtained from rat-1 fibroblasts stably transfected with  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes. Total RNA obtained from cells transfected with the  $\alpha_{1a}$ - (lanes a),  $\alpha_{1b}$ - (lanes b), or  $\alpha_{1d}$ - (lanes d) adrenoceptor genes was electrophoresed, transferred to membranes, and hybridized using labeled receptor probes (top). Autoradiograph is representative of eight experiments performed with identical results.

legends to Figs. 3 and 4). Norepinephrine induced an immediate increase in  $[Ca^{2+}]_i$ , followed by a slower decrease toward basal levels; the peak of the immediate  $[Ca^{2+}]_i$  response was used to calculate the dose-response curves. For  $[^3H]InsP_3$  production, maximal accumulation was observed 15 min after hormone addition, and this time was selected for these experiments. Cells expressing the  $\alpha_{1a}$  subtype had a very strong response to norepinephrine in both  $[Ca^{2+}]_i$  and  $[^3H]InsP_3$  production (Figs. 3 and 4, respectively). In these cells, the agonist induced an  $\sim 8$ -fold increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and an  $\sim 4$ -fold increase in  $[^3H]InsP_3$  production, with similar  $EC_{50}$  values (i.e.,  $\sim 300$  nM and  $\sim 500$  nM, respectively). Cells expressing the  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptor increased  $[Ca^{2+}]_i$  ( $\sim 3$ -fold) and  $[^3H]InsP_3$  ( $\sim 2$ -fold) production in response to norepinephrine (Fig. 3), with an  $EC_{50}$  of  $\sim 200$  nM for both pro-

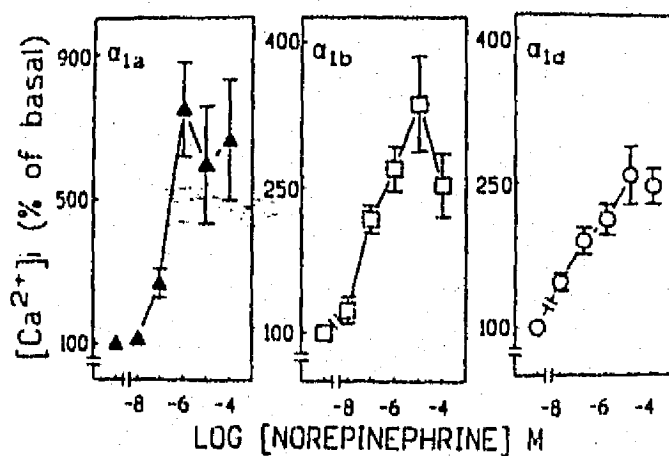


Fig. 3. Effect of norepinephrine on  $[Ca^{2+}]_i$  in rat-1 fibroblasts expressing  $\alpha_{1a}$ - (▲),  $\alpha_{1b}$ - (■), or  $\alpha_{1d}$ - (○) adrenoceptors. Results are presented as a percentage of basal  $[Ca^{2+}]_i$  values: (a)  $\alpha_{1a}$  cells,  $211 \pm 4$  nM; (b)  $\alpha_{1b}$  cells,  $192 \pm 3$  nM; and (c)  $\alpha_{1d}$  cells,  $208 \pm 8$  nM. Data are mean values. Vertical lines, standard error of 5–12 experiments in each case.

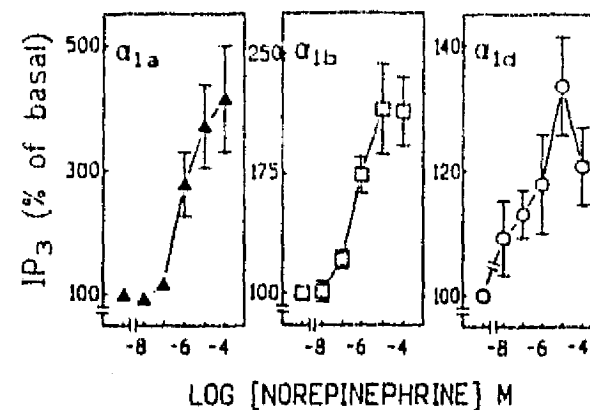


Fig. 4. Effect of norepinephrine on  $[^3H]InsP_3$  ( $IP_3$ ) production in rat-1 fibroblasts expressing  $\alpha_{1a}$ - (▲),  $\alpha_{1b}$ - (■), or  $\alpha_{1d}$ - (○) adrenoceptors. Results are presented as percentage of basal  $[^3H]InsP_3$  productions: (a)  $\alpha_{1a}$  cells,  $1343 \pm 318$  cpm/well; (b)  $\alpha_{1b}$  cells,  $1675 \pm 340$  cpm/well; and (c)  $\alpha_{1d}$  cells,  $1547 \pm 330$  cpm/well. Data are mean values. Vertical lines, standard error of five or six experiments in each case.

cesses. Interestingly, in the rat-1 fibroblasts that expressed  $\alpha_{1d}$ -adrenoceptors, a very modest increase in  $[^3H]InsP_3$  production was observed ( $\sim 30\%$  increase over basal levels, Fig. 4), and the maximal increase observed in the dose-response curve for  $[Ca^{2+}]_i$  was  $\sim 150\%$  over basal levels (Fig. 3). As expected, the functional responses to  $1 \mu M$  norepinephrine were blocked by  $10 \mu M$  phentolamine in the three cell lines studied (data not shown).

The acute effect of PMA on the  $\alpha_1$ -adrenergic action was studied. Fibroblasts expressing the different adrenergic receptor subtypes were incubated in the presence of  $10 \mu M$  norepinephrine in the absence or presence of different concentrations of PMA, and  $[^3H]InsP_3$  production was assayed. PMA by itself did not alter basal  $[^3H]InsP_3$  production. In cells expressing the  $\alpha_{1d}$  subtype, PMA inhibited the  $\alpha_1$ -adrenergic response at low concentrations (Fig. 5). In contrast, the adrenergic actions in cells expressing  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptors were essentially insensitive to the active phorbol ester (Fig. 5). Rat-1 fibroblasts that expressed  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptors had an intermediate response; i.e., PMA inhibited the effect of

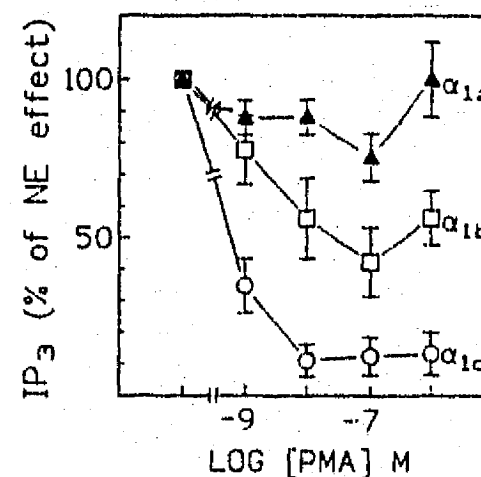


Fig. 5. Effect of PMA on the  $\alpha_1$ -adrenergic-mediated increase in  $[^3H]InsP_3$  ( $IP_3$ ) production. Cells were incubated in the presence of  $10 \mu M$  norepinephrine (NE) and different concentrations of PMA; results are presented as percentage of norepinephrine effect. Other indications are as in legend to Fig. 3.

norepinephrine, but the blockade was only partial (~50%) and relatively high concentrations were required (Fig. 5).

The effect of PMA was also tested on the  $[Ca^{2+}]_i$  response. For this purpose, PMA was added to the cells 30 sec before the agonist. The tumor promoter did not alter basal  $[Ca^{2+}]_i$ . In these experiments, a similar pattern was observed. PMA dose-dependently inhibited the effect of 10  $\mu M$  norepinephrine in cells expressing  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptors (Fig. 6). Fibroblasts that expressed the  $\alpha_{1d}$  subtype were very sensitive to the action of PMA; even with a relatively high concentration of agonist (100  $\mu M$  norepinephrine), the active phorbol ester blocked dose-dependently the response at relatively low concentrations (Fig. 6). In contrast, cells that expressed the  $\alpha_{1a}$  subtype were very resistant to the action of PMA; even when a relatively low concentration of agonist (1  $\mu M$  norepinephrine) was used, the active phorbol ester did not inhibit the  $[Ca^{2+}]_i$  response (Fig. 6). The use of different concentrations of agonist involves the actions of different mechanisms. To test this point, we challenged the cells with different concentrations of norepinephrine in the absence or presence of 1  $\mu M$  PMA. The results showed that cells expressing  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptors were very insensitive to PMA, whereas those expressing the other subtypes were much more sensitive, and this effect was not dependent on the dose of agonist (data not shown).

It is well known that sustained activation of protein kinase C with active phorbol esters induces down-regulation of the enzyme and refractoriness to PMA (28). We tested the effect of overnight treatment with PMA (100 nM) on the  $\alpha_1$ -adrenergic-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  response. Pretreatment with PMA did not affect the effect of norepinephrine on this parameter but abolished the acute effect of 1  $\mu M$  PMA in cells expressing  $\alpha_{1d}$  or  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptors (Fig. 7). Fibroblasts expressing the  $\alpha_{1a}$  subtype were, as expected, insensitive to PMA under these conditions.

When cells were challenged with increasing concentrations of norepinephrine, the  $[Ca^{2+}]_i$  response decreased sequentially, indicating that the cells became desensitized. This effect was not due to depletion of the calcium pools in cells expressing the  $\alpha_{1b}$  or  $\alpha_{1d}$  subtype, as demonstrated by the

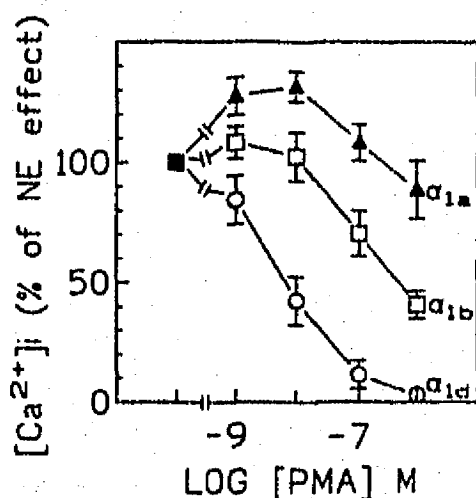


Fig. 6. Effect of PMA on the  $\alpha_1$ -adrenergic-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Cells were incubated in the presence of norepinephrine (NE) (1  $\mu M$ ,  $\alpha_{1a}$  cells; 10  $\mu M$ ,  $\alpha_{1b}$  cells; and 100  $\mu M$ ,  $\alpha_{1d}$  cells) and different concentrations of PMA. Results are presented as percentage of norepinephrine effects. Other indications are as in legend to Fig. 3.

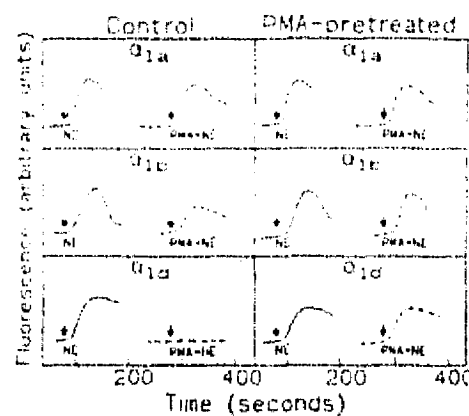


Fig. 7. Effect of overnight preincubation with 100 nM PMA on the acute effect of PMA on the  $\alpha_1$ -adrenergic-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Cells were incubated overnight in the absence or presence of 100 nM PMA. The effect of norepinephrine (NE) (1  $\mu M$ ,  $\alpha_{1a}$  cells; 10  $\mu M$ ,  $\alpha_{1b}$  cells; and 100  $\mu M$ ,  $\alpha_{1d}$  cells) on  $[Ca^{2+}]_i$  is presented. PMA (1  $\mu M$ , dotted lines) was added 30 sec before norepinephrine. Data are representative of three separate experiments with each cell line.

ability of 10 nM endothelin to increase  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 8). In cells expressing the  $\alpha_{1a}$  subtype, 10 nM endothelin induced a large increase in  $[Ca^{2+}]_i$  but this effect was no longer observed in cells previously challenged with norepinephrine (Fig. 8). Interestingly, norepinephrine induced desensitizations identical to those just described in cells preincubated overnight with PMA (data not shown).

## Discussion

Our results indicate that the three cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptors expressed in rat-1 fibroblasts are coupled to the phosphoinositide/calcium signal transduction pathway. This is consistent with what has been observed by other authors using different cell lines (6-9, 29-32). It is particularly interesting that in rat-1 fibroblasts expressing similar receptor densities, the abilities of the  $\alpha_1$ -adrenergic subtypes to activate this pathway differed. In our experiments, the  $\alpha_{1a}$  subtype had considerable more efficacy to activate this signal transduction pathway than the other subtypes; the  $\alpha_{1d}$  subtype had particularly low efficacy.

In some cell systems, receptor density seems to be associated with the ability of receptors to activate signaling pathways; Esbenshade *et al.* (31) observed a linear correlation between receptor density and maximum  $[^3H]InsP$  production

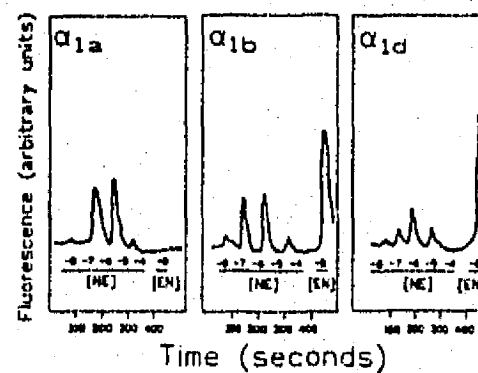


Fig. 8. Effect of sequential addition of norepinephrine (NE) on  $[Ca^{2+}]_i$ . Norepinephrine was added at the times and concentrations indicated. EN, endothelin. Data are representative of six or seven separate experiments with each cell line.

in DDT<sub>1</sub> MF-2 cells, and Horie and Tsujimoto (30) reported that the  $[Ca^{2+}]_i$  response increased disproportionately in response to the  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptor density in CHO cells. In our experiments, the differences observed in receptor density do not seem to explain the distinct efficacy of the receptor subtypes; i.e., the receptor density of cells that expressed the  $\alpha_{1a}$  subtype was smaller than that of the cells transfected with the  $\alpha_{1b}$  subtype, but the maximal response of the former cells was considerable larger. Similarly, the response of the cells transfected with  $\alpha_{1d}$  receptors was considerable smaller than that of the cells that expressed the  $\alpha_{1a}$  subtype, despite the fact that the receptor densities of these two cell clones were very similar. However, we cannot ignore potential differences due to clonal variation. Wise *et al.* (32) also studied  $\alpha_1$ -adrenergic actions in rat-1 fibroblasts transfected to express the  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes; these authors observed distinct receptor densities in their cells but did not detect any major variation in receptor efficacy. They reported that receptor occupation accelerated degradation of  $G_{11\alpha}/G_{q\alpha}$ ; the agonist-induced degradation of these G proteins was greater in the cells expressing  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptors, but this was attributed to the higher observed receptor density (32).

The most interesting finding in our study was the difference observed in sensitivity to PMA. The order of sensitivity was  $\alpha_{1d} > \alpha_{1b} \gg \alpha_{1a}$ . Again, this difference does not seem to be explained by disparate receptor densities. However, a correlation exists with the ability of the subtypes to activate the signaling pathway. Comparison of the putative intracellular sequences of the three cloned subtypes revealed main differences in the intracellular loops and the carboxyl-terminal tail. These domains seem to be important both for G protein coupling and as target sites for phosphorylations. The putative protein kinase C phosphorylation sites (consensus sequence X-(Arg/Lys)<sub>1-3</sub>(X)<sub>0-2</sub>-(Ser/Thr)-(X)<sub>0-2</sub>(Arg/Lys)<sub>1-3</sub>-X) present in these receptors are (a) for the  $\alpha_{1a}$  subtype, Thr224 (third intracellular loop) and Ser351 and Ser407 (carboxyl terminus) (none of these sites are conserved in the other receptor subtypes); (b) for the  $\alpha_{1b}$  subtype, Thr233 (corresponding to Thr278 of the  $\alpha_{1d}$  receptor), Thr252 (third intracellular loop), and Ser369 and Ser440 (carboxyl terminus); and (c) for the  $\alpha_{1d}$  subtype, Ser195 (second intracellular loop), Thr278 and Thr322 (third intracellular loop), and Ser424, Ser448, and Ser480 (carboxyl terminus). There are other putative phosphorylation sites in these receptors. At this point, the role of these sites is unknown. However, it is worth mentioning that truncation of the  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptor carboxyl terminus impairs phosphorylation and desensitization (19).

Differences have been observed in the  $\alpha_1$ -adrenergic sensitivity to PMA in hepatocytes isolated from diverse species and that express distinct  $\alpha_1$ -adrenoceptors (20, 21); liver cells that express the  $\alpha_{1b}$  subtype were more sensitive than those that express the  $\alpha_{1a}$  receptor. Thus, the data obtained with liver cells that naturally express the receptor subtypes are consistent with those that were obtained with the transfected clones. The data obtained with cells pretreated overnight with PMA strongly suggest that this effect is mediated through isoform or isoforms of protein kinase C that are subjected to down-regulation. The isoform or isoforms of protein kinase C that mediate this effect have not been defined.

An additional interesting finding was the observation that repeated  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation induces desensitization

of the response and that such desensitization is observed even in cells that have been pretreated overnight with PMA. These data indicate that processes in addition to protein kinase C activation are involved in  $\alpha_1$ -adrenoceptor desensitization. Lattion *et al.* (19) presented evidence that receptor phosphorylation by protein kinases other than protein kinase C plays a role in  $\alpha_{1b}$ -receptor desensitization. Our results are consistent with these findings. The type of desensitization induced by repeated stimulation with norepinephrine in cells that express the  $\alpha_{1b}$ - and  $\alpha_{1d}$ -adrenoceptors was homologous, as demonstrated by the ability of endothelin to elevate  $[Ca^{2+}]_i$ . In cells that express the  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptor, no  $[Ca^{2+}]_i$  response to endothelin was observed after repeated stimulation with norepinephrine, which suggests that the adrenergic stimulation may have induced depletion of the hormone-sensitive calcium pools. This is consistent with the finding that this adrenoceptor subtype had greater efficacy than the other subtypes. However, the possibility that other processes could be involved cannot be ruled out.

PMA not only induces the blockade/desensitization of  $\alpha_1$ -adrenoceptors but also alters the subcellular distribution of these receptors. Fonseca *et al.* (33) elegantly showed that PMA induced internalization to endosomes of  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptors stably expressed in human embryonic kidney 293 cells. This effect is also induced by agonists, and, interestingly, it is blocked by staurosporine, an inhibitor of protein kinase C, which suggests a physiological role of protein kinase C in agonist-induced receptor internalization (33).

The distribution of mRNA for the different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in human tissues has shown that in most tissues there is coexpression of several subtypes, although one of these subtypes may predominate (34). Signal transduction is the language through which cells communicate and transmodulate their responsiveness. Cells that receive a message may alter their responses differentially through receptor subtypes with diverse sensitivity to such modulation. In this physiological context, the observation that  $\alpha_1$ -adrenergic subtypes have different sensitivities to protein kinase action may be of importance.

#### Acknowledgments

The authors express their gratitude to Drs. Lee Allen, Robert J. Lefkowitz, and Marc G. Caron for generously providing the transfected rat-1 fibroblasts.

#### References

- Schwinn, D. A., J. W. Lomasney, W. Lorenz, P. J. Sklut, R. T. Frameau, T. L. Yang-Feng, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, and S. Cotecchia. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel  $\alpha_1$ -adrenergic subtype. *J. Biol. Chem.* 265:8183-8189 (1990).
- Cotecchia, S., D. A. Schwinn, R. R. Randall, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, and B. K. Kobilka. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster  $\alpha_1$ -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7159-7163 (1988).
- Lomasney, J. W., S. Cotecchia, W. Lorenz, W.-Y. Leung, D. A. Schwinn, T. L. Yang-Feng, M. Brownstein, R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron. Molecular cloning and expression of the cDNA for the  $\alpha_{1A}$ -adrenergic receptor, the gene for which is located on human chromosome 5. *J. Biol. Chem.* 266: 8365-8369 (1991).
- Peraz, D. M., M. T. Plascik, and R. M. Graham. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 40:876-883 (1991).
- Hieble, J. P., D. B. Bylund, D. E. Clarke, D. C. Eikenburg, S. Z. Langer, R. J. Lefkowitz, K. P. Minneman, and R. R. Ruffolo Jr. International Union of Pharmacology. X. Recommendations for nomenclature of  $\alpha_1$ -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.* 47:267-270 (1995).
- Cotecchia, S., B. K. Kobilka, K. W. Daniel, R. D. Nolan, E. Y. Lapetina, M.

- G. Caron, R. J. Lefkowitz, and J. W. Regan. Multiple second messenger pathways of  $\alpha$ -adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 265:63-69 (1990).
7. Schwinn, D. A., S. O. Page, J. P. Middleton, W. Lorenz, S. B. Liggett, K. Yamamoto, E. G. Lapetina, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, and S. Cotecchia. The  $\alpha_{1C}$ -adrenergic receptor: characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity. *Mol. Pharmacol.* 40:619-626 (1991).
  8. Perez, D. M., M. B. DeYoung, and R. M. Graham. Coupling of the expressed  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol. Pharmacol.* 44:784-795 (1993).
  9. Wu, D., A. Katz, C.-H. Lee, and M. I. Simon. Activation of phospholipase C by  $\alpha_1$ -adrenergic receptors is mediated by the  $\alpha$  subunits of Gq family. *J. Biol. Chem.* 267:25798-25802 (1992).
  10. Nantel, F., H. Bonin, L. J. Emorine, V. Zilberfarb, A. D. Strosberg, M. Bouvier, and S. Marullo. The human  $\beta_2$ -adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol. Pharmacol.* 43:548-555 (1993).
  11. Kurose, H., and R. J. Lefkowitz. Differential desensitization and phosphorylation of three cloned and transfected  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* 269:10093-10099 (1994).
  12. Corvers, S., and J. A. García-Sáinz. Phorbol esters inhibit  $\alpha_1$ -adrenergic regulation of hepatocyte metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:1128-1133 (1984).
  13. Corvers, S., K. R. Schwarz, R. M. Graham, and J. A. García-Sáinz. Phorbol esters inhibit  $\alpha_1$ -adrenergic effects and decrease the affinity of liver  $\alpha_1$ -adrenergic receptors for epinephrine. *J. Biol. Chem.* 261:620-626 (1986).
  14. Leeb-Lundberg, L. M. F., S. Cotecchia, J. W. Lomasney, J. F. DeBernardis, R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron. Phorbol esters promote  $\alpha_1$ -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5651-5655 (1985).
  15. García-Sáinz, J. A., S. M. T. Hernández-Sotomayor, and M. I. Tussie-Luna. Homologous and heterologous desensitization of one of the pathways of the  $\alpha_1$ -adrenergic action: effects of epinephrine, vasopressin, angiotensin II and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochim. Biophys. Acta* 887:73-79 (1986).
  16. García-Sáinz, J. A., and S. M. T. Hernández-Sotomayor. Inhibitors of protein kinase C block the  $\alpha_1$ -adrenergic refractoriness induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Eur. J. Biochem.* 163:417-421 (1987).
  17. Leeb-Lundberg, L. M. F., S. Cotecchia, A. DeBiasi, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist-promoted desensitization of  $\alpha_1$ -adrenoceptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 262:3098-3105 (1987).
  18. Bouvier, M., L. M. F. Leeb-Lundberg, J. L. Benovic, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. 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 (1987).
  19. Lattion, A.-L., D. Diviani, and S. Cotecchia. Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 269:22887-22893 (1994).
  20. García-Sáinz, J. A., M. T. Romero-Avila, R. Alcántara-Hernández, M. Macías-Silva, J. A. Olivares-Reyes, and C. González-Espinoza. Species heterogeneity of hepatic  $\alpha_1$ -adrenoceptors:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1C}$  subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:760-767 (1992).
  21. García-Sáinz, J. A., and M. Macías-Silva. Species heterogeneity of liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors: subtypes, signal transduction and regulation. *Pharmacol. Commun.* 6:53-60 (1995).
  22. Chomczynski, P., and N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159 (1987).
  23. Heindereich, K. A., T. Zepellin, and L. J. Robinson. Insulin and insulin-like growth factor I induce c-fos expression in postnatal neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 268:14663-14670 (1993).
  24. Mattingly, R. R., W. J. Wasilenko, P. J. Woodring, and J. C. Garrison. Selective amplification of endothelin-stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium signaling by v-src transformation in rat-1 fibroblast. *J. Biol. Chem.* 267:7470-7477 (1992).
  25. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275 (1951).
  26. Berridge, M. J., R. M. C. Dawson, P. Downes, J. P. Heslop, and R. F. Irvine. Changes in the level of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phospholipids. *Biochem. J.* 212:473-482 (1983).
  27. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450 (1985).
  28. Coode, N. T., M. A. N. Hajibagheri, and P. J. Parker. Protein kinase C (PKC)-induced down-regulation: association with up-regulation of vesicle traffic. *J. Biol. Chem.* 270:2669-2673 (1995).
  29. Minneman, K. P., T. L. Tharous, S. Hollinger, C. Han, and T. A. Esbenhade. Selectivity of agonists for cloned  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 46:929-936 (1994).
  30. Horie, K., and G. Tsujimoto. Effect of receptor density on the receptor-effector coupling: use of cloned and stably expressed  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors in CHO cells. *Eur. J. Pharmacol.* 288:303-309 (1995).
  31. Esbenhade, T. A., X. Wang, N. G. Williams, and K. P. Minneman. Inducible expression of  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors in DDT1 MF-2 cells: comparison of receptor density and response. *Eur. J. Pharmacol.* 289:305-310 (1995).
  32. Wise, A., T. W. Lee, D. J. MacEwan, and G. Milligan. Degradation of G11 $\alpha$ /Gq is accelerated by agonist occupancy of  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1C}$  adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 270:17196-17203 (1995).
  33. Fonseca, M. I., D. C. Button, and R. D. Brown. Agonist regulation of  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor subcellular distribution and function. *J. Biol. Chem.* 270:8902-8909 (1995).
  34. Price, D. T., R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, D. Berkowitz, and D. A. Schwinn. Localization of mRNA for three distinct  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human adrenergic physiology. *Mol. Pharmacol.* 45:171-175 (1994).

Send reprint requests to: Dr. J. Adolfo García-Sáinz, Departamento de Bioenergética y Biomembranas, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-248, México D. F. 04510, México. E-mail: agarcia@ficsun1.iffirol.unam.mx

Endothelin induces phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor transfected to Rat-1 fibroblasts. Comparison with the effect of Norepinephrine.

José Vázquez-Prado, Luz del Carmen Medina and J. Adolfo García-Sáinz\*

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México

\* To whom correspondence should be addressed

**ABSTRACT.**

Phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor as a result of stimulation with norepinephrine or Protein Kinase C activation has been considered necessary to regulate receptor desensitization by probably independent mechanisms. In this work, the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor, expressed by stable transfection to Rat-1 fibroblasts, induced by activation of endogenous endothelin receptors, is demonstrated. The mechanism of the endothelin-1 induced phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor was assessed using inhibitors for serine/threonine and tyrosine kinases, a dose dependent attenuation in the phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor was detected in cells preincubated with staurosporin or genistein, suggesting that both kind of kinases could be involved, by independent pathways, in the process. No inhibition was observed by preincubation with pertussis toxin. In cells chronically-pretreated with phorbol myristate acetate, an important increase in the basal phosphorylation was detected, that could not be further increased by any stimulus, suggesting that in unstimulated cells, Protein Kinase C could regulate the basal phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor in a negative way or that some phorbol ester-sensitive Protein Kinase C isoforms are not completely depleted and instead remained active, maintaining elevated the phosphorylation of the receptor. Interestingly, the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor induced by endothelin-1 was stronger and faster than the resultant of its homologous activation, suggesting a plausible mechanism of cross-regulation.

**ABREVIATIONS:**  $\alpha_{1b}$ -AR,  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor; NE, norepinephrine; ET-1, endothelin-1; PMA, phorbol-12-myristate-13 acetate; PKC, protein kinase C; MAPK, mitogen activated protein kinase; PKA, protein kinase A; EGF-R, epidermal growth factor receptor; PTX, pertussis toxin; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid.

## INTRODUCTION.

Endothelin-1 (ET-1) is a 22 aminoacid peptide produced by endothelial cells that regulates different cellular activities through receptors coupled to G proteins. It is one of the most potent vasoconstrictors for smooth muscle cells regulating the vascular tone (Riddihough, 1994). ET receptors stimulate phosphatidylinositol hydrolysis leading to intracellular calcium mobilization and PKC activation; but they also activate other intracellular signaling pathways; including arachidonic acid release; modulation of the intracellular concentration of cAMP in a way specific for different cell types, and phosphorylation of several proteins in tyrosine residues, leading in some cases, to activation of the MAP-kinase pathway (Haber, and Lee, 1994; James, *et al*, 1994 and Ono, *et al*, 1994). It has recently been suggested that expression of c-fos and other cellular responses elicited by endothelin are mediated by activation of c-Src (Simonson, Wang and Herman, 1996). Besides, phosphorylation of focal adhesion kinase has also been detected in cells responding to an endothelin stimulus (Zachary, *et al*, 1993; Saville, *et al*, 1994).

One of the most interesting aspects of endothelin receptors is their ability to elicit activation of different cellular pathways that influence the activity of other receptors present in the same cell. Recently, it has been demonstrated the ability of ET-1 to transmodulate positively the activity of epidermal growth factor receptors in Rat-1 fibroblasts, in which the activation of ET<sub>A</sub> receptors elicited phosphorylation of EGF-R and association of GRB-2 and SHC with it, leading to activation of the receptor in the absence of its ligand (Daub, *et al*, 1996). In myocardial infarction, catecholamines generate arrhythmias mediated through  $\beta$ -adrenergic receptors. Action that is notably counteracted by activation of ET<sub>A</sub> receptors; in this example, ET inhibits the activity of adenylyl cyclase through the action of a pertussis-toxin-sensitive GTP-binding protein, turning-off the activity of PKA (James, *et al*, 1994; Ono, *et al*, 1994). Interestingly, in cardiac myocytes, both ET-1 and phenylephrine induce translocation of certain PKC isoforms, being the effect of ET-1 stronger. Both agents induced the translocation of PKC- $\delta$  and PKC- $\epsilon$ . The

translocation of PKC- $\epsilon$ , induced by phenylephrine, is barely detectable. neither hormone caused any consistent translocation of PKC- $\alpha$  or PKC- $\zeta$ , however, MAP-kinase was activated with a similar order of potency (Clerk, *et al*, 1994). In rat inner medullary collecting duct, endothelin inhibits vasopressin stimulated water permeability, this effect involves both, an inhibitory G protein (sensible to PTX) and the activation of PKC (sensible to calphostin) (Nadler, *et al*, 1992). Blockade of ET<sub>A</sub> receptors, with the specific antagonist BQ-123, inhibits contractions in rabbit aorta induced by Angiotensin II without affecting its ability to elicit the increase in inositol phosphates; this effect was specific for Angiotensin II, since contraction induced by norepinephrine was not affected (Webb, *et al*, 1992).

In Rat-1 fibroblasts, endothelin generates multiple responses, this agonist increases the production of IP<sub>3</sub> and this process does not suffer homologous desensitization or blockade by PKC. ET-1 stimulates the incorporation of labeled thymidine and the generation of choline that is abolished in cells where PKC was down-regulated, indicating regulation of PLD by PKC (van der Bend, *et al*, 1992). Some of the rapid responses generated by ET in Rat-1 cells are not mediated by the activation of PKC since chronic treatments with phorbol myristate acetate does not modify the transcription of c-fos and c-jun elicited by the presence of ET. In contrast, DNA synthesis was markedly reduced if the stimulation is made in cells depleted of PKC.

In previous studies, we have demonstrated that phorbol myristate acetate attenuates the action of  $\alpha_{1b}$ -AR transfected to Rat-1 fibroblasts (Vázquez-Prado, and García-Sáinz, 1996). Indeed, it has been demonstrated that, in those cells, activation of PKC by phorbol esters results in the phosphorylation of this receptor (Lattion, Diviani and Cotecchia, 1994). In the present work, we explored the effect of ET<sub>A</sub> receptor activation which in these cells is coupled to phosphoinositide turnover and can be used as a model to induce PKC activation. Besides, since ET-1 has also been shown to induce activation of tyrosine kinases in Rat-1 cells; we explored the signaling pathway that regulate the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR and used inhibitors to explore the mechanism employed by



the ET<sub>A</sub> receptor to mediate that effect. The phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR elicited by interaction with norepinephrine and by activation of PKC with phorbol esters was also evaluated in parallel experiments. Our results showed that  $\alpha_{1b}$ -AR can be phosphorylated in response to the activation of endothelin receptors and that both kinds of kinases known to be modulated by these receptors, in this cellular model, could participate in the event, since both staurosporin and genistein partially blocked the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR. The effect of endothelin was stronger and faster than the effect of norepinephrine, suggesting a rapid mechanism of heterologous regulation.

#### MATERIAL AND METHODS.

**Materials.** (-)-Norepinephrine, endothelin, PMA, prazosin, propranolol and protease inhibitors were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Phentolamine was a generous gift from Ciba-Geigy (Summit, NJ). BQ-123 was from Research Biochemicals (Natick, MA). Epidermal Growth Factor, DMEM, fetal bovine serum, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from GIBCO BRL (Gaithersburg, MD). <sup>125</sup>Iodo-aryl-azido-prazosin (2 200 Ci/mmol) and <sup>32</sup>P orthophosphate (8500-9120 Ci/mmol) were from New England Nuclear (Boston, MA). Sepharose-coupled protein A was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). PTX was purified as described (Sekura, *et al*, 1983).

**Cell lines and culture.** Rat-1 fibroblasts transfected with the hamster  $\alpha_{1b}$ -AR (Cotecchia, S, *et al*, 1988; provided by Drs RJ Lefkowitz, M Caron and L Allen; Duke University) were cultured in glutamine-containing high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 300  $\mu$ g/ml neomycin analog G-418 sulfate (GIBCO), 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin and 0.25  $\mu$ g/ml amphotericin B at 37°C under a 95 % air/5 % CO<sub>2</sub> atmosphere as described previously (Vázquez-Prado, and García-Sáinz, 1996). For the experiments, cells at confluence were serum deprived in unsupplemented DMEM for 24 hrs.

**Photoaffinity labeling of the  $\alpha_{1b}$ -AR.** One hundred micrograms of membranes from Rat-1 cells expressing  $\alpha_{1b}$ -AR (2.04 +/- 0.47 pmol/mg protein, KD = 0.3 +/- 0.04 nM) prepared as previously described (Vázquez-Prado, and García-Sáinz, 1996), were incubated in the dark with 6 nM of  $^{125}$ Iodo-aryl-azido-prazosin (NEN) essentially as described by Lattion (Lattion, Diviani and Cotecchia, 1994) for 1.0 hr at room temperature; then, 1.0 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA containing protease inhibitors (leupeptin 20  $\mu$ g/ml, aprotinin 20  $\mu$ g/ml, PMSF 100  $\mu$ g/ml, bacitracin 500  $\mu$ g/ml and soybean trypsin inhibitor 50  $\mu$ g/ml) was added and the tubes were exposed to UV light for 3 min (Stratalinker, Stratagene). Membranes were centrifuged at 12 000 rpm, 4°C for 15 min, washed once and electrophoresed in 10% SDS-PAGE minigels under reducing conditions. Specificity of the labeling was determined using phentolamine, or prazosin as competitors as indicated.

**Immunoprecipitation of  $\alpha_{1b}$ -AR.** Immunoprecipitation of  $\alpha_{1b}$ -AR was standardized using photoaffinity labeled membranes. Rabbit antiserum against the last 10 aminoacids from the carboxi-terminal sequence of the hamster  $\alpha_{1b}$ -AR was obtained by immunizing rabbits with the indicated peptide coupled to keyhole limpet hemocyanin prepared by Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). Serum samples with a titer above 1:5 000, determined by ELISA, were used. Membranes were solubilized with 1.0 ml of lysis 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  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1.0 mM p-serine, 1.0 mM p-threonine and the above mentioned protease inhibitors) for 1.0 hr at 4°C; the lysed extract was centrifuged at 12 000 rpm for 15 min at 4°C and the supernatant was transferred to new tubes containing 10  $\mu$ l of immune serum and 40  $\mu$ l of sepharose-coupled protein A. Tubes were incubated overnight at 4°C. Beads were washed five times (1.0 ml/each) with 50mM Hepes, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 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; once with 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4, twice (0.2 ml/each) with PBS, pH 5.0 and once with 1.0 ml of 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4. Washed beads were

boiled in 100  $\mu$ l of Laemmli sample buffer containing 5 % mercapto-ethanol and electrophoresed in 10 % SDS-PAGE minigels, transferred to nitrocellulose and exposed to X-OMAT X Ray-film (Kodak) at -80°C with an intensifying screen. Autoradiographies were analyzed with the Collage software, version 2.0.

**Phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR.** Rat-1 fibroblasts expressing the  $\alpha_{1b}$ -AR were grown to confluence in 10 cms culture dishes and serum starved for 24 hrs. The day of the experiment, cells were maintained in phosphate free DMEM during an hour and then incubated in 3 ml of the same medium containing [ $^{32}$ P]Pi (0.05 mCi/ml) for 3 hr at 37 °C.  $^{32}$ P-labeled cells were stimulated with ET-1, NE, EGF or PMA as indicated, then they were washed twice with ice-cold phosphate buffered saline and lysed with 1.0 ml of ice-cold lysis buffer. The plates were then maintained for 1.0 hr on ice; then the extract was centrifuged at 12 000 rpm for 15 min, at 4°C, and the supernatant was transferred to new tubes containing 10  $\mu$ l of anti- $\alpha_{1b}$ -AR antiserum and 40  $\mu$ l of sepharose-coupled protein A and immunoprecipitated as described above. The effect of staurosporin and genistein on the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR was assayed by preincubating these agents in labeling medium for the time and concentrations indicated on the figures. The effect of chronic PMA pretreatment was assessed incubating the cells at different concentrations of PMA (100 nM or 250 nM) during 2 days, the first day in complete medium and the second in unsupplemented DMEM, control cells were incubated with DMSO 0.1 %.

**PTX treatment of the cells.** Transfected Rat-1 fibroblasts, in 10 cms dishes, were incubated for 16-24 hrs with or without PTX (100 ng/ml). The presence of PTX was continued throughout all the phosphorylation period.

## RESULTS.

In this study, the "cross-talk" between two G protein-coupled receptors known to activate phosphoinositide turnover was studied. Particularly, the influence of ET<sub>A</sub> receptors over the phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR, expressed by transfection in Rat-1 fibroblasts. An antibody directed to the last ten carboxi-terminal aminoacids of the hamster  $\alpha_{1b}$ -AR (Cotecchia, *et al*, 1988) was used to immunoprecipitate it. The procedure was standardized with membranes where the receptor was labeled by photoaffinity crosslinking with <sup>125</sup>Iodo-aryl-azido-prazosin. The labeling of the receptor was specific since it was blocked with phentolamine (Fig 1a) and prazosin (Result not shown). Several variables that could influence the efficiency of the immunoprecipitation were estimated. Figure 1b shows that  $\alpha_{1b}$ -AR is specifically immunoprecipitated from <sup>125</sup>Iodo-aryl-azido-prazosin-labeled membranes and the procedure was most efficient when it was performed overnight at 4°C compared to 1 hr at the same temperature. No immunoprecipitation of  $\alpha_{1b}$ -AR was detected with preimmune serum used as control in the same conditions that got a maximum efficiency with immune serum (Fig 1b). The  $\alpha_{1b}$ -AR immunoprecipitated from extracts of ET-1 stimulated cells was strongly phosphorylated in a way dependent on the concentration of ET-1 used (Fig 2a, b), reaching a maximum at 1.0 min (Fig 3a, b) and sensitive to blockade by preincubation with BQ-123 (Fig 2d, e), a selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist, which is the subtype reported to be present in Rat-1 cells (Ambar and Sokolovsky, 1993). The action of NE was also dose-dependent (Fig 2a, c) and slightly slower, reaching a maximum at 5 min (Fig 3a, b).

Since some effects of ET-1 have been reported to be mediated by activation of PKC or tyrosine kinases, we investigated the participation of these enzymes in the events that lead to the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR. Preincubation of the cells with staurosporin or genistein partially inhibited the phosphorylation elicited by activation of ET<sub>A</sub> receptors (Fig 4a, b; and Fig 4c, d; respectively). One of the traditional experimental approaches that have been used to search for the participation of PKC in cellular responses is the depletion of

phorbol ester sensitive subtypes by chronic stimulation with PMA. We applied this experimental approach to the study of the phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR. The results showed that in cells pretreated with PMA for 48 hrs a strong increase in the basal phosphorylation of the receptor was detected and the effect of ET-1 and NE was attenuated (Fig 5a, b). As control, the effect of acute PMA stimulation was evaluated and its action was attenuated when compared to basal (Fig 5a, b).

Several intracellular actions of endothelin are known to be conducted with the participation of PTX-sensitive G proteins, we then investigated the effect of chronic PTX treatment over the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR induced by stimulation of endothelin receptors compared to that induced by norepinephrine. For this purpose, cells were incubated in serum free DMEM for 16-24 hours with 100 ng/ml of PTX and the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR was assayed as described before. The presence of PTX diminished the basal phosphorylation of the receptor but, in PTX treated cells, an increment in the phosphorylation induced by both agonists was detected. As a control, the ability of PMA to stimulate the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR was evaluated. The results showed that direct activation of PKC is sufficient to increase the phosphorylation of the receptor in PTX pretreated cells (Fig 6).

Since it has recently been shown that ET-1 induces tyrosine phosphorylation and activation of EGF-R in Rat-1 fibroblasts; we tested if the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR induced by activation of  $ET_A$  receptors is mediated by EGF-R. The autoradiography on Figure No. 7 shows that EGF does not have a significant influence on the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR.

## DISCUSSION.

In the present work, the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR expressed by stable transfection in Rat-1 fibroblasts was studied. Our results demonstrate that activation of endogenous  $ET_A$  receptors, lead to phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR that is faster and higher than the effect mediated by homologous activation, suggesting a plausible mechanism of rapid heterologous regulation that could involve the participation of serine/threonine and tyrosine kinases, since the effect is partially blocked by staurosporin and genistein. The time course in the  $\alpha_{1b}$ -AR phosphorylation followed by ET-1 stimulation is similar to the time course detected for the translocation of PKC- $\delta$  and PKC- $\epsilon$  isoforms in neonatal ventricular myocytes stimulated with ET-1 (Clerk, *et al*, 1994). Interestingly, the isoforms of PKC detected in Rat-1 fibroblasts (Berti, *et al*, 1994) and in neonatal ventricular myocytes (Clerk, *et al*, 1994) are the same ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$ ), suggesting that  $\delta$  and  $\epsilon$  PKC-isoforms could be involved in the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR induced by activation of  $ET_A$  receptors in Rat-1 cells. Moreover, the experiments in neonatal ventricular myocytes showed that the translocation of  $\delta$  and  $\epsilon$  PKC-isoforms is stronger in the cells activated with ET-1 than in those in which phenylephrine was used. Similar order of potency was detected in this study for the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR induced by  $ET_A$  and  $\alpha_1$ -adrenergic agonists. Moreover, it has been reported that PMA-activated PKC elicits a stronger phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR than the action of an homologous stimulus (Lattion, *et al*, 1994).

Several studies have demonstrated the cross-regulation between receptors coupled to different signal transduction pathways. For example, activation of adenylyl cyclase counter-regulates phosphoinositide turnover through phosphorylation of PLC by PKA (Liu, and Simon, 1996). cAMP signaling pathway can be modulated through tyrosine kinase receptors; for example, the hepatic actions of  $\beta$ -adrenergic receptors are blocked by insulin (Heyworth and Houslay, 1983) and G-protein-coupled receptors can influence the activity of tyrosine kinase receptors in a negative or in a positive way: i) PKA

phosphorylates Insulin receptors decreasing their activity and ii) phosphorylation of tyrosine residues in EGF-R is elicited by activation of ET<sub>A</sub> receptors in Rat-1 cells, leading to the association of GRB2 and SHC with the EGF-R and activation of the MAP-kinase pathway (Daub, *et al*, 1996). In the case of G-protein coupled receptors linked to phosphoinositide turnover and intracellular calcium mobilization, the cross-regulation has been difficult to establish due to the labile characteristics of the mediators formed, and the recovery period required to elicit maximum calcium responses. Heterologous regulation in this system is supposed to occur mainly by competition between the receptors and effectors for the G proteins (Neubig, 1994). Direct effect over the receptors has been less studied, but some examples suggest cross regulation at this level. For example, it has been shown that ET-1 induces internalization of thrombin receptors in a PKC mediated process (Chen, *et al*, 1995).

Endothelin has been shown to cross-regulate the activity of other receptors in different cell systems: in neuroblastoma-glyoma hybrid cells it induces partial heterologous desensitization of the calcium response elicited by ATP and has no influence over the response elicited by bradykinin (Chau, *et al*, 1993). In rat urinary bladder, ET-1 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<sub>2</sub> alpha or bradykinin (Donoso, *et al*, 1994). In cardiac myocytes, ET-1 enhance the calcium transient triggered by ATP and this effect was sensitive to inhibitors of protein kinase C and also it inhibits a K<sup>+</sup> current by means of a PKC-dependent mechanism (Damron, *et al* 1993).

Studies on the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR have reported the participation of PKC, activated by phorbol esters, and GRK, responding to homologous desensitization, in the process. The structural determinants required by both kinases seem to be localized to the carboxi-terminal tail of the receptor, where the consensus phosphorylation sites are present, or at least the sites required for the interaction with the kinases that

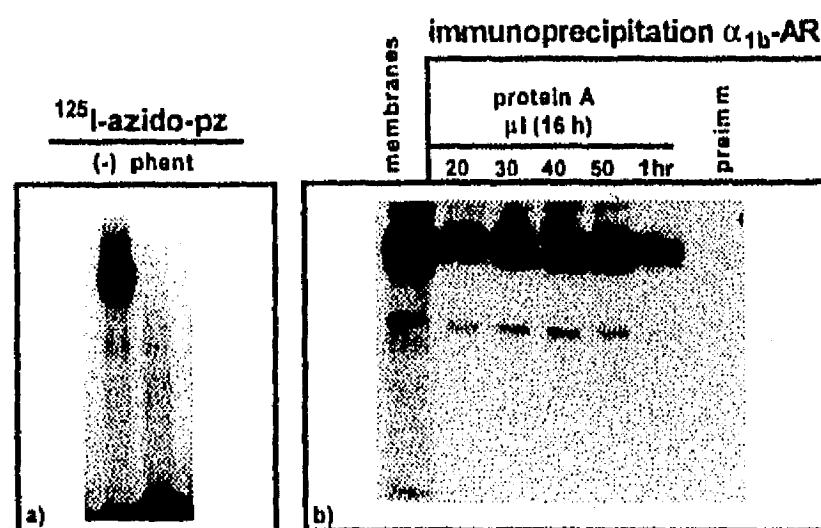
phosphorylate the receptor. The phosphorylation achieved by PKC activation or by homologous stimulation may be mediated by different mechanisms. Phosphorylation mediated by PMA is inhibited by the PKC-inhibitor Ro 31 8220 while the phosphorylation induced by NE remained intact (Lattion, *et al* 1994). GRK-2 and GRK-3 seem to be required for the homologous desensitization of the  $\alpha_{1b}$ -AR since cotransfection of the receptor with each one of them induced an increase in the phosphorylation of the receptor mediated by NE, whereas the cotransfection of it with catalitically inactive mutants blocked the effect, leading to attenuation of the desensitization process (Diviani, *et al*, 1996). The heterologous desensitization of the  $\alpha_{1b}$ -AR is suggested by the blockade of its activity mediated by PMA-activated PKC, coincident with an increase in its phosphorylation (Leeb-Lundberg, *et al*, 1985; Lattion, *et al*, 1994). However, until now, no direct influence of the activation of the phosphoinositide turnover pathway by stimulation of a co-expressed G protein-coupled receptor on the phosphorylation state of the  $\alpha_{1b}$ -AR has been reported. It has been found that the activation of  $\alpha_{1b}$ -AR transfected in Rat-1 cells reduced the endothelin-induced  $IP_3$  response that is recovered after some time of the initial stimulus. In that report, a transient depletion of inositol phosphate pools was suggested as the cause of attenuation of ET-1 response (Lattion, Diviani and Colecchia, 1994); however, according to our results, the influence of ET-1 over NE response, a regulatory mechanism involving phosphorylation of the receptor, seems to exist.

The participation of serine/threonine and tyrosine kinases in the ET-1 induced phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR is supported by the partial inhibition achieved by staurosporin and genistein depending of the dose employed. The partial blockade obtained by each inhibitor suggest that both kinds of kinases acted by independent pathways in the phosphorylation of the receptor; neither one of them seemed to be mediated by PTX-sensitive G proteins. 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  $IP_3$  and calcium induced by endothelin was dramatically amplified. In contrast, thrombin-dependent responses were slightly reduced

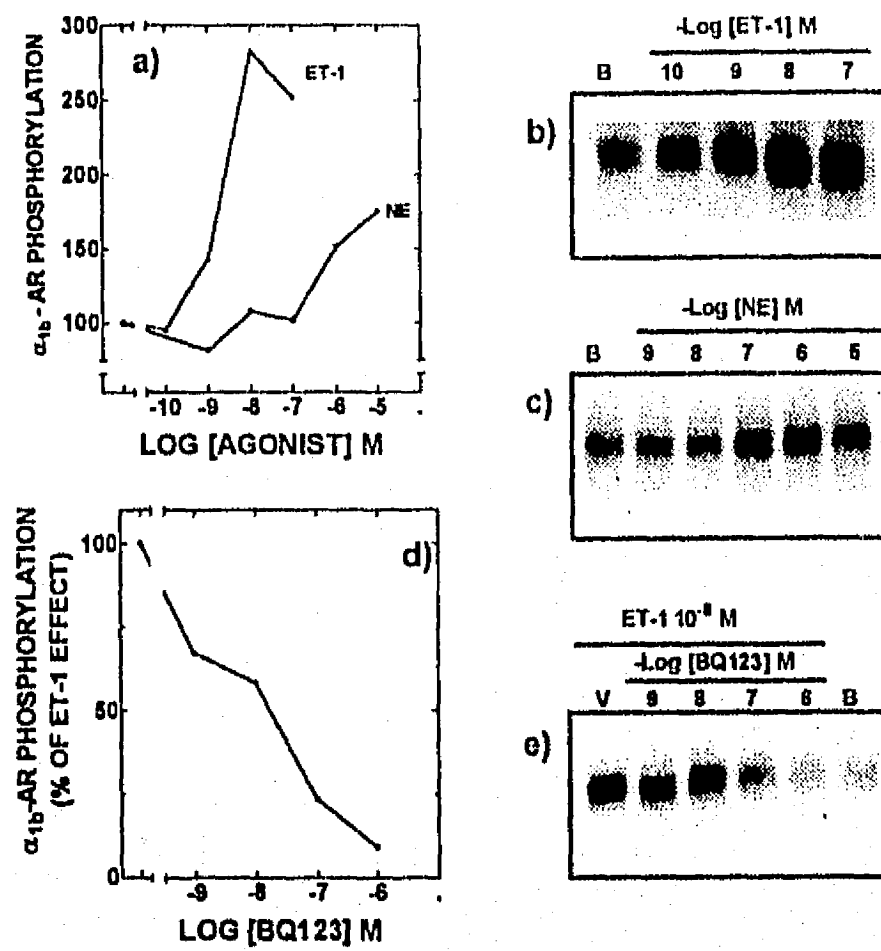


(Mattingly, *et al*, 1992). Moreover, the effect of v-Src remains associated to the membrane and no change in ET-1 binding sites was detected. Focal adhesion kinase is subjected to tyrosine phosphorylation in Rat-1 fibroblasts stimulated with endothelin and this effect was attenuated when the activity of PKC was down-regulated or inhibited. Besides, pp42 and pp44 forms of MAP 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 (Saville *et al*, 1994). On the other hand, Rat-6 fibroblasts overexpressing PKC- $\beta$ 1 showed increased calcium signaling in the presence of endothelin; in this case, an increase in the number of ET<sub>A</sub> receptors was detected (Pachter, *et al*, 1993). It could be expected that GRKs may be activated by ET<sub>A</sub> receptors; however, in Rat-1 fibroblasts, no homologous desensitization of the increase of IP<sub>3</sub> induced by ET-1 has been detected (Plevin *et al*, 1991). Since GRKs are reported to phosphorylate only receptors in the occupied state, the participation of these kinases in the heterologous phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR seems unlikely. However, since we have no evidence on the activation of GRKs after ET-1 stimulation, we can not rule out the possibility of their participation.

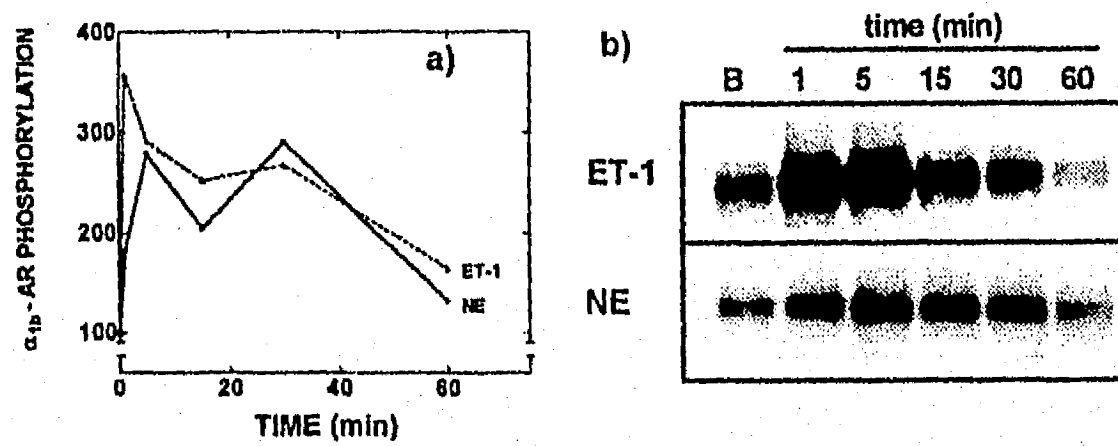
Endothelin receptors and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors co-exist in several cells (cardiac myocytes, hepatocytes and vascular smooth muscle cells) where it could be expected that the activation of endothelin receptors may regulate the actions of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. The results of our experiments could contribute to understand the mechanism of cross-regulation between endothelin and  $\alpha_1$ -adrenergic responses. For example, in cardiac myocytes both agonists induce expression of several genes, including atrial natriuretic factor, often associated with cardiac hypertrophy, and as mentioned, they modify the subcellular localization of certain PKC isoforms. (Mc Donough, *et al*, 1993; Van-Heugten *et al*, 1993; Clerk, *et al*, 1994).



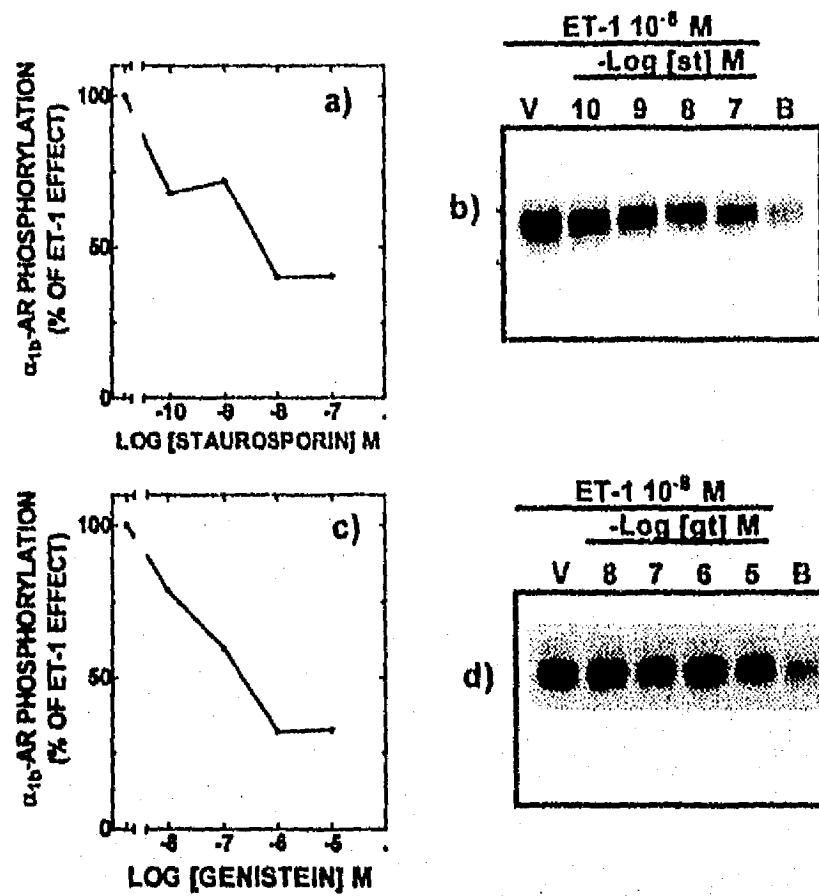
**Fig No.1 Photoaffinity labeling and immunoprecipitation of the  $\alpha_{1b}$ -AR.** a) Autoradiography showing the  $\alpha_{1b}$ -AR from membranes of transfected Rat-1 fibroblasts labeled with  $^{125}\text{I}$ -aryl-azido-prazosin ( $^{125}\text{I}$ -azido-pz) as described in Methods, specificity of the labeling was determined with  $10^{-6}$  M phentolamine (phent). b)  $^{125}\text{I}$ -aryl-azido-prazosin labeled membranes (membranes) were lysed and immunoprecipitated with an antibody directed against the last 10 carboxy-terminal aminoacids of the  $\alpha_{1b}$ -AR as described in Methods; the immunoprecipitation of the  $\alpha_{1b}$ -AR was optimized evaluating different conditions including buffers, incubation times and quantity of protein A used; as an example, the evaluation of different quantities of sepharose-coupled protein A (protein A) is shown; no band was detected when preimmune serum was used (preimm). Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE minigels and electro-transferred to nitrocellulose. Figure shows a representative autoradiography of at least three independent experiments.



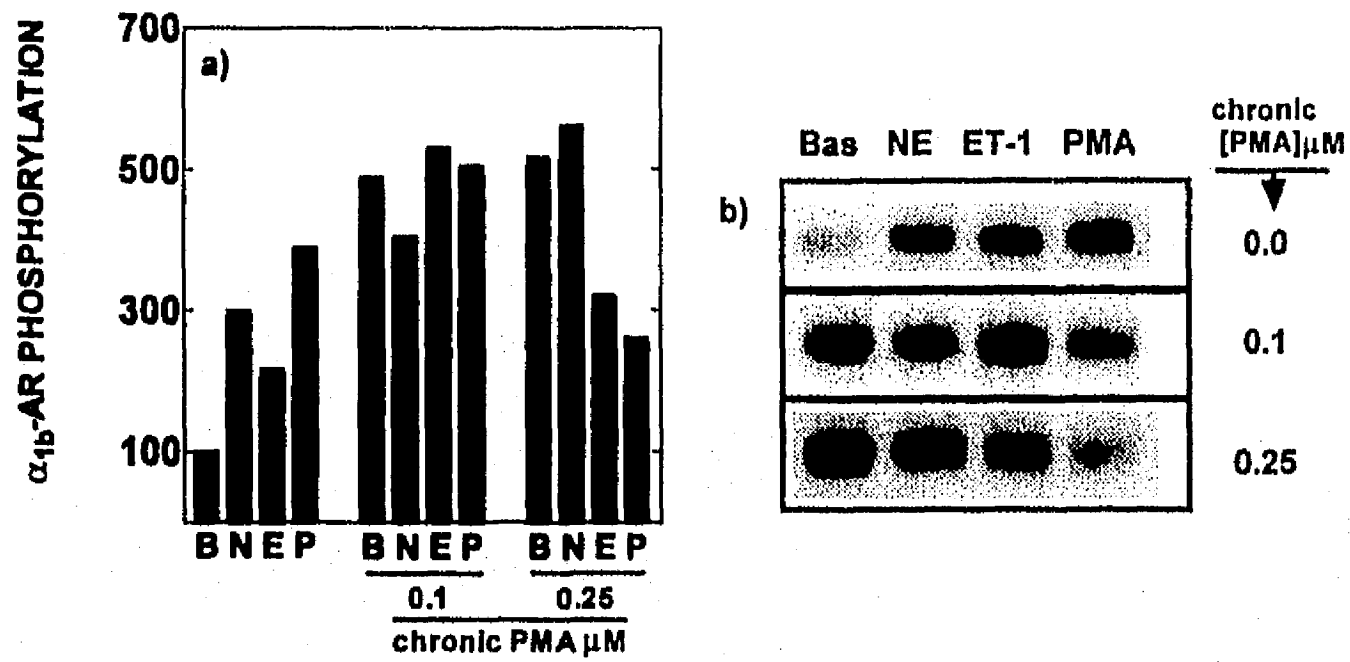
**Figure No.2. Dose response curve of ET-1 and NE induced phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR and blockade by BQ-123 on the action of ET-1.**  $^{32}$ P-labeled-Rat-1 fibroblasts expressing the  $\alpha_{1b}$ -AR were stimulated with the indicated concentrations of ET-1 or NE for 5 min and the  $\alpha_{1b}$ -AR was immunoprecipitated as described in Methods. Curves in (a) represent the mean effect of three independent experiments; a representative autoradiography for the effect of ET-1 and NE is shown in (b) and (c) respectively. Curve in (d) represent the effect of BQ-123 on the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR induced by ET-1 (the mean of two independent experiments was plotted). The  $ET_A$  antagonist was preincubated for 10 min before the stimulation with ET-1; a representative autoradiography is shown in (e). The phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR, was analyzed by the intensity of the respective autoradiography and normalized to the phosphorylation of untreated cells (lane B) to which an arbitrary value of 100 was assigned. The phosphorylation of the ET-1-stimulated receptor that was not pretreated with the antagonist is shown in V.



**Figure No. 3. Time course of ET-1 and NE induced phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR.**  $^{32}$ P-labeled- Rat-1 fibroblasts expressing the  $\alpha_{1b}$ -AR were stimulated with  $10^{-8}$  M ET-1 or  $10^{-5}$  M NE for the indicated times and the phosphorylation of the immunoprecipitated  $\alpha_{1b}$ -AR was detected as described in Fig 2. Curves in (a) represent the mean of three (ET-1) or two (NE) independent experiments. A representative autoradiography for the effect of ET-1 or NE is shown in (b), the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR in untreated cells is shown in lane B.



**Figure No. 4.** Effect of the PKC inhibitor staurosporin and tyrosine kinase inhibitor genistein on ET-1 induced phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR.  $^{32}$ P-labeled-Rat-1 fibroblasts expressing the  $\alpha_{1b}$ -AR were preincubated with the indicated concentrations of staurosporin for 20 min (a) or genistein for 30 min (c) and the phosphorylation of the immunoprecipitated  $\alpha_{1b}$ -AR was detected as described in Fig 2. Curves in (a) and (c) represent the means of two independent experiments. A representative autoradiography for the effect of staurosporin (st) or genistein (gt) is shown in (b) and (d) respectively. The phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR in ET-1 stimulated cells that were not pretreated with the kinase inhibitors is shown in lane V and the phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -AR in untreated cells is shown in lane B; in both cases, DMSO (the vehicle of the inhibitors) was added. No effect of the inhibitors on the basal phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR was detected (not shown).



**Figure No. 5. Effect chronic PMA preincubation on ET-1, NE or PMA Induced phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR.**  $^{32}\text{P}$ -labeled-Rat-1 fibroblasts expressing the  $\alpha_{1b}$ -AR were preincubated for 48 hrs with the indicated concentrations PMA and the phosphorylation of the immunoprecipitated  $\alpha_{1b}$ -AR was detected as described in Fig 2. Bars on (a) represent the mean of three independent experiments from which a representative is shown in (b). Data were analyzed as described in Figure No. 2. Abbreviations in bars: B, basal; N, norepinephrine, E, endothelin-1 and P, PMA.

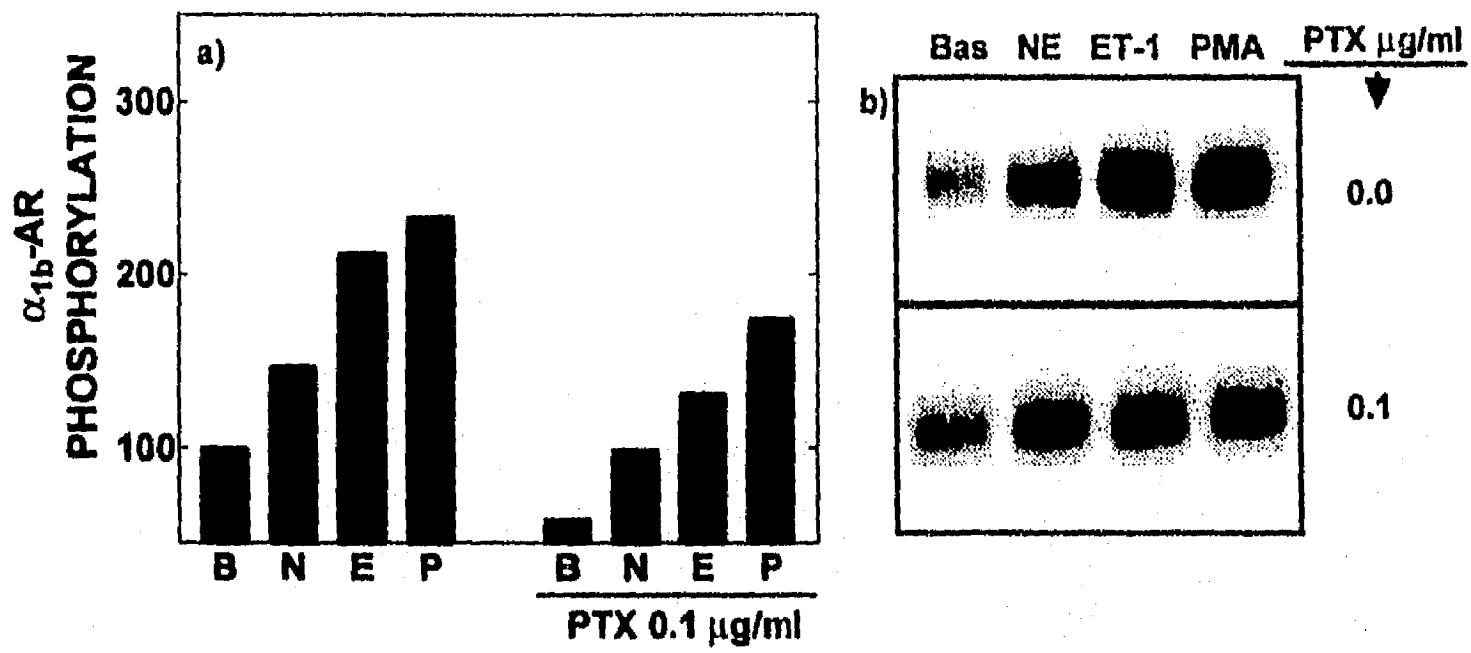
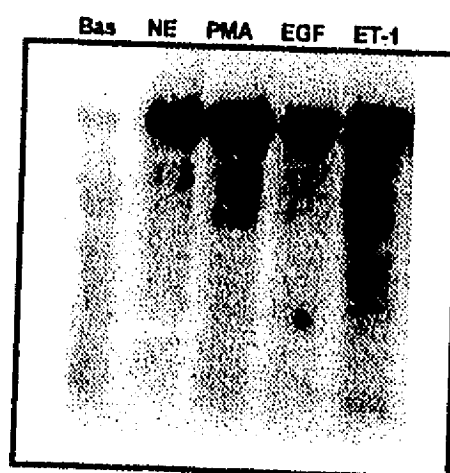


Figure No. 6. Effect PTX on ET-1, NE or PMA induced phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR.  $^{32}$ P-labeled-Rat-1 fibroblasts expressing the  $\alpha_{1b}$ -AR were preincubated for 16-24 hrs with 0.1  $\mu$ g/ml of PTX and the phosphorylation of the immunoprecipitated  $\alpha_{1b}$ -AR was detected as described in Fig 2. Bars on (a) represent the mean of three independent experiments from which a representative is shown in (b). Data were analyzed as described in Figure No. 2. Abreviations in bars as in Fig. No. 5.



**Figure No. 7. Effect EGF, ET-1, NE or PMA on the phosphorylation of the  $\alpha_{1b}$ -AR.**  $^{32}\text{P}$ -labeled-Rat-1 fibroblasts expressing the  $\alpha_{1b}$ -AR were stimulated with EGF ( $10^{-8}$  M), NE ( $10^{-5}$  M), ET-1 ( $10^{-8}$  M) or PMA ( $10^{-6}$  M) and the phosphorylation of the immunoprecipitated  $\alpha_{1b}$ -AR was detected as described in Fig 2. A representative autoradiography of three independent experiments is shown.



**REFERENCES.**

- Riddihough, G, 1994; Nature 369:84.
- Haber, E and ME Lee, 1994; Nature 370:252-253.
- James, AT, *et al*, 1994; Nature 370:297-300.
- Ono, K, *et al*, 1994; Nature 370:301-304.
- Simonson, MS, Y Wang and WH Herman, 1996; J Biol Chem 271(1):77-82.
- Zachary, I, *et al*, 1993; J Biol Chem 268(29):22060-22065.
- Saville MK. *et al*, 1994; Biochem J 301(pt2):407-414.
- Daub, H, *et al*, 1996; Nature 379:557-560.
- Clerk, A, *et al*, 1994; J Biol Chem 269(52):32848-32857.
- Nadler, SP *et al*, 1992; J Clin Invest 90(4):1458-1466.
- Webb, ML, *et al*, 1992; Biochem Biophys Res Comm 185(3):887-892.
- van der Bend, RL. *et al*, 1992; Biochem J 285(Pt1):235-240.
- Vázquez-Prado, J and JA García-Sáinz, 1996; Molecular Pharmacol 50:17-22.
- Lattion, AL, D Diviani and S Cotecchia, 1994; J Biol Chem 269(36):22887-22893.
- Sekura, RD, *et al*, 1983. J Biol Chem 258:14647-14651.
- Cotecchia, S, *et al*, 1988; Proc Natl Acad Sci USA 85:7159-7163.
- Ambar, I and M Sokolovsky, 1993; Eur J Pharmacol 245:31-41.
- Berti, L, *et al*, 1994; J Biol Chem 269(5):3381-3386.
- Liu, M and MI Simon, 1996; Nature 382:83-87.
- Heyworth and Houslay, 1983; Biochem J 214:547-552.
- Neubig, R, 1994. FASEB J 8:939-946.
- Chen, X, *et al*, 1995; Biochem Biophys Res Comm 217(2):445-451.
- Chau, LY, *et al* 1993; J Neurochem 60(2):454-460.
- Donoso, MV, *et al*, 1994; Br J Pharmacol 111(2):473-482
- Damron, DS, *et al* 1993; J Biol Chem 268(36):27335-44.
- Diviani, D, *et al*, 1996; J Biol Chem 271(9):5049-5058.
- Leeb-Lundberg, *et al*, 1985; Proc Natl Acad Sci USA 82:5651-5655.
- Mattingly, RR, *et al*, 1992; J Biol Chem 267:7470-7477.

Pachter, JA, *et al*, 1993; Biochem J 294(pt1):153-158.

Plevin R, *et al*, 1991; Biochem J 280(pt3)609-615.

Mc Donough, PM, *et al*, 1993; Am J Physiol 264(2pt2):625-630.

Van-Heugten HA, *et al*, 1993; J Mol Cell Cardiol 25(1):41-52.

#### **XIV. DISCUSIÓN.**

La principal conclusión de los experimentos presentados en el primer trabajo, es la existencia de diferencias claras, entre los tres subtipos hasta ahora conocidos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, en relación a su potencia para generar segundos mensajeros intracelulares se refiere, cuando ellos son expresados por transfección en clonas independientes de fibroblastos de la línea celular Rat-1. Así mismo, se detectaron diferencias importantes en su sensibilidad al bloqueo por la PKC activada por ésteres de forbol. Mientras que el patrón de desensibilización homóloga resultó similar.

##### **a) Activación de la vía de fosfoinosítidos-calcio por los distintos subtipos de receptores $\alpha_1$ adrenérgicos.**

En cuanto a la actividad de los subtipos de receptores mencionados, expresados a niveles similares (alrededor de 1 a 2 pmol/mg de proteína membranal) resultó interesante que el orden de potencia fue notablemente diferente, siendo el subtipo  $\alpha_{1a}$  más potente que el  $\alpha_{1b}$  y este a su vez que el  $\alpha_{1d}$ ; además, su habilidad para influir en la respuesta de receptores para endotelina, expresados endógenamente en los fibroblastos Rat-1, fue también distinta. Los resultados mostraron que los receptores para endotelina fueron bloqueados en su capacidad para inducir la liberación de calcio de reservorios intracelulares, cuando los fibroblastos que expresaban el subtipo  $\alpha_{1a}$  adrenérgico fueron inicialmente estimulados con dosis crecientes de norepinefrina; mientras que la estimulación de los subtipos  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$ , en las clonas correspondientes, no mostró efecto negativo alguno sobre los receptores para endotelina. Puesto que los diferentes subtipos  $\alpha_1$  adrenérgicos se desensibilizaron diferencialmente, al menos de forma heteróloga, y mostraron una capacidad particular para influir la respuesta de otros receptores acoplados también al recambio de fosfoinosítidos, podemos pensar que la respuesta de una célula o tejido que exprese más de uno de los receptores estudiados va a depender del resultado de todas las interacciones.

Aún cuando tradicionalmente (Bourne, 1995) se había considerado que la activación de un receptor inducía una cascada lineal de eventos bioquímicos que permitían la generación de una respuesta celular, actualmente sabemos que tal cascada lineal es en realidad un abanico y que un mismo receptor puede estar acoplado a varios sistemas de transducción en una misma célula. Por ejemplo, el receptor  $\alpha_{2A}$  adrenérgico puede acoplarse a  $G_i$ ,  $G_q$  y  $G_s$  (Chabre, et al, 1994). Mientras que el receptor adrenérgico  $\alpha_{1b}$  puede activar a las vías de la fosfolipasa C y de la fosfolipasa  $A_2$  por acoplamiento a proteínas G diferentes (Pérez, DeYoung y Graham, 1993). Desde luego, a la fecha no conocemos el abanico de reacciones bioquímicas que cada uno de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos es capaz de generar en los fibroblastos Rat-1, pero su capacidad de modular de manera diferencial la respuesta de otros receptores endógenos, sugiere que estos receptores activan de forma particular a distintas proteínas reguladoras del sistema de transducción de fosfoinosítidos-calcio, al cual tanto los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, como los receptores para endotelina, se encuentran acoplados.

#### **b) Desensibilización homóloga.**

La adición de concentraciones crecientes de norepinefrina dió un patrón similar de incremento del calcio intracelular; notablemente, en los tres casos, la adición de concentraciones mayores de la hormona, precedidas por estímulos menores, reveló que los primeros fueron capaces de desensibilizar al sistema; además, este patrón de respuesta no se vió influido por un tratamiento crónico con PMA. Teniendo en consideración que un tratamiento prolongado con PMA resulta en la depleción celular de las formas de PKC sensibles a este agente, los resultados obtenidos sugieren que las formas de PKC sensibles a PMA no intervienen de manera indispensable en el proceso de desensibilización homóloga.

**c) Coincidencias en la regulación de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos transfectados y los expresados naturalmente en hepatocitos de distintas especies.**

Los estudios previos realizados en nuestro laboratorio con hepatocitos de distintas especies, que expresan de manera natural distintos subtipos  $\alpha_1$  adrenérgicos, coincidieron con los hallazgos del presente trabajo. Así por ejemplo, el receptor  $\alpha_{1a}$  expresado en los fibroblastos Rat-1 fue insensible a bloqueo por PMA, de manera similar a lo observado en hepatocitos de conejo que expresan este subtipo; por su parte, el subtipo  $\alpha_{1b}$  que está presente en los hepatocitos de rata, es bloqueado por PMA al igual que el  $\alpha_{1b}$  expresado por transfección en las células Rat-1, usadas como modelo en este estudio. Estas similitudes sugieren que las características de actividad y capacidad para sufrir desensibilización pueden ser atribuidas a la estructura primaria de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, aunque ciertamente el entorno celular en que éstos se expresen debe tener una influencia fundamental en su comportamiento.

**d) Regulación de receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos-calcio.**

La regulación de los receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos parece tener una naturaleza distinta de la que hasta ahora ha sido caracterizada, con mayor detalle, para los receptores que se encuentran acoplados al sistema de la adenilil ciclasa (Wojcikiewicz, Tobin y Nahorski, 1993). La participación de las cinasas específicas de los receptores acoplados a proteínas G en el proceso de desensibilización homóloga de los receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos, que ha sido claramente demostrada para los receptores que modulan al AMPc ha sido sujeta de intenso debate para los que modulan el recambio de fosfoinosítidos-calcio. Diversos trabajos dedicados al estudio de distintos receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos-calcio, a través de una proteína G, han demostrado que éstos son sensibles a bloqueo mediado por activación de la PKC, a continuación se citan algunos ejemplos:

- 1) La movilización de calcio intracelular que se observa en células DDT<sub>1</sub>-MF2

estimuladas con histamina o ATP es inhibida por incubación previa de las células con la forma activa de forbol dibutirato; sin embargo, la desensibilización homóloga de cada uno de los receptores estimulados ocurre a pesar de la presencia del Ro 31-8220 que es considerado un inhibidor específico de la PKC (Dickenson y Hill, 1993).

2) El receptor metabotrópico  $1\alpha$  de glutamato, transfectado en células BHK, sufre fosforilación en presencia de su ligando y puesto que ésta se bloquea por el uso de inhibidores específicos de la PKC, la participación de esta enzima resulta plausible en el proceso de desensibilización homóloga de este receptor (Alaluf, *et al* 1995).

3) Los receptores para bradicinina que se expresan en astrocitos son bloqueados por PMA; en este mismo estudio se reveló que el estímulo hormonal conduce a la translocación de las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$  de la PKC y que el PMA es capaz también de inhibir la activación de la PLC lograda con la adición de floruro de aluminio, que activa a la subunidad alfa de las proteínas G, pero no el estímulo logrado por un ionóforo de calcio, lo que sugirió que el bloqueo inducido por la PKC se circunscribe a nivel de la proteína G (Chen, *et al*, 1995).

4) Los receptores para el péptido formilado (derivado de bacterias y que sirve como quimioatrayente para algunas células del sistema inmune) que se expresan en las células de la línea HL-60 se acoplan a la activación tanto de la PLC como de la PLD y resulta interesante que solo la activación de la primera enzima se bloquea por la activación de la PKC (Lederer, *et al*, 1993).

5) La desensibilización de los receptores muscarínicos acoplados al recambio de fosfoinosítidos ha sido difícil de detectar, esto particularmente porque el  $IP_3$  generado no es un producto estable y no existen inhibidores específicos que permitan impedir su degradación, un estudio reciente mostró el perfil de producción del  $IP_3$  por estímulo de receptores muscarínicos: en los primeros diez segundos se genera un pico que es seguido de una respuesta sostenida, el pico inicial no se genera en células pretratadas con el agonista lo que habla de una desensibilización homóloga, sin embargo ésta no parece estar mediada por la PKC (Wojcikiewicz, *et al*, 1994).

6) Un ejemplo en el que queda demostrada claramente la participación de la PKC en

el proceso de desensibilización homóloga de un receptor acoplado al sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, ante un estímulo crónico, es el del receptor para péptido liberador de gastrina; mutantes de éste, en las que las serinas y treoninas consideradas sitios consenso de fosforilación para la PKC se sustituyeron por alaninas, fueron incapaces de sufrir desensibilización, a diferencia del receptor silvestre; en los experimentos referidos, se preincubó con bombesina durante 24 hrs; adicionalmente, la internalización de los receptores mutantes se vió atenuada (Benya, *et al*, 1995).

#### **e) Desensibilización heteróloga.**

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos son susceptibles a un bloqueo parcial o total, por la acción del PMA, en el incremento de la concentración de calcio citosólico e inositol trisfosfato, generado como respuesta a la presencia de norepinefrina, en las células que expresan el subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$  respectivamente y que esto no ocurre en los fibroblastos que expresan el subtipo adrenérgico  $\alpha_{1a}$ , sugiriendo que la acción bloqueadora de la PKC es ejercida a nivel del receptor mismo, por fosforilación de éste. De hecho, la fosforilación del receptor adrenérgico  $\alpha_{1b}$  como respuesta a la adición de PMA ha sido claramente demostrada (Lattion, *et al*, 1994; Leeb-Lundberg, *et al*, 1985; y resultados presentados en el segundo manuscrito que se incluye en esta tesis). Cabe mencionar que en nuestros estudios, no pudo ser detectada la fosforilación del subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{1a}$ , que es la forma que mostró resistencia a bloqueo por PMA; sin embargo, la inmunoprecipitación de este subtipo, demostrada por el uso de membranas en las que el receptor había sido marcado por fotoafinidad con iodo-azido-prazosina, fue muy pobre, por lo que este resultado negativo no puede considerarse concluyente aún cuando coincide con las predicciones resultantes de la falta de sensibilidad de este subtipo al bloqueo por activación de la PKC (ver más adelante).

En los fibroblastos Rat-1 se ha demostrado que el PMA es capaz de bloquear la acción del receptor a neurocinina transfectedo que, al igual que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, se acopla al recambio de fosfoinosítidos; un hallazgo interesante (equivalente al que se ha reportado para el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico en estas mismas células) es que la eliminación del dominio carboxilo-terminal del receptor antes mencionado inhibe la desensibilización homóloga y el bloqueo inducido por PMA. Además cuando este receptor truncado es expresado por transfección en células COS o en células Sf9 es incapaz de sufrir fosforilación en presencia de su agonista o de PMA (Alblas, *et al* 1995)

Un hallazgo de nuestro estudio es que el bloqueo inducido por PMA, en la actividad de cada subtipo de receptor  $\alpha_1$  adrenérgico, es inversamente proporcional a la potencia detectada para cada uno de ellos. Se podría especular que el más activo es el menos sensible debido a su potencia intrínseca y esto podría resultar cierto si el bloqueo ocurriera en un sitio de la vía de transducción común para los tres receptores y no en el receptor mismo. Sin embargo, debe recalarse que el nivel de expresión de cada uno de ellos fue bastante similar. De hecho, el subtipo  $\alpha_{1b}$ , que fue el más abundante, no resultó ser el más potente. Así pues, las diferencias detectadas en la actividad de cada subtipo no pueden ser atribuidas a las diferencias en el número de receptores expresados. Desde luego, hubiera sido ideal contar con clonas en las que los receptores expresados a concentraciones similares dieran una respuesta fisiológica similar; sin embargo, la capacidad intrínseca de cada subtipo para acoplarse a un mismo sistema de transducción parece ser diferente de acuerdo a lo demostrado en otros estudios, por lo que la situación ideal es probablemente imposible de obtener en el laboratorio. En este sentido, se ha publicado que el receptor adrenérgico del subtipo  $\alpha_{1a}$  se acopla más eficientemente a la formación de  $IP_3$  que los subtipos  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$  (Schwinn, *et al*, 1991) y este orden de potencia se ha detectado invertido solo en el caso de que el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico es expresado por transfección en mucho mayor abundancia que el  $\alpha_{1a}$ ; en este caso, la respuesta de las células que expresaban ocho veces mas receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico fue del doble en comparación con las que expresaban el  $\alpha_{1a}$  (Minneman, *et al*, 1994).



Además, nuestros datos mostraron que el perfil de desensibilización homóloga es bastante parecido, por ello, nos inclinamos a pensar que la desensibilización inducida por el PMA refleja probablemente características intrínsecas de cada subtipo en cuanto a su sensibilidad para ser modulados por la PKC.

La regulación diferencial de los subtipos  $\alpha_1$  adrenérgicos por la PKC podría ser particularmente relevante en la etapa tardía del proceso de desensibilización en la que la participación de esta cinasa, concretamente en el evento de internalización del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, inducido por el agonista, ha sido recientemente demostrada (Fonseca, *et al*, 1995) En este contexto, se ha visto que un estímulo crónico de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, transfectados en fibroblastos Rat-1, conduce a la disminución en el contenido celular de la subunidad  $\alpha_q$  de las proteínas G, intermediaria para la activación de la PLC en la vía de fosfoinosítidos-calcio, además de disminuir los niveles de expresión de los receptores (Wise, *et al*, 1995). En tal estudio, se demostró que la disminución en el contenido de la subunidad  $\alpha_q$  de las proteínas G era debida a un acortamiento en la vida de la proteína, en tanto que los niveles de su RNA mensajero permanecieron constantes, la especificidad de la regulación a nivel de esta vía se determinó al detectar que la subunidad  $\alpha_i$  de las proteínas G, que modula negativamente a la adenilil ciclasa y que no se acopla a los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, permaneció constante (Wise, *et al*, 1995). Así mismo, en otro estudio en el que se emplearon células de músculo liso, se demostró que la estimulación crónica de los receptores  $\alpha_{1b}$  adrenérgicos condujo a una disminución en los niveles de RNA mensajero de éstos y que este proceso era dependiente de la activación de la PKC (Izzo, *et al*, 1994). Así pues, la participación de la PKC en la desensibilización homóloga de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, y particularmente del subtipo  $\alpha_{1b}$  que es el que ha sido motivo de varios estudios, podría situarse después de las primeras etapas de este proceso, el cual en su inicio podría estar regulado por la intervención de una cinasa específica del receptor, perteneciente al grupo de las GRKs (Lattion, *et al* 1994) que de acuerdo a informes recientes podría a su vez ser modulada por la PKC (Chuang, *et al*, 1995). Esto podría ayudar a explicar el por qué la

desensibilización homóloga detectada en los tres subtipos parece ser similar en tanto que la desensibilización heteróloga detectada por activación de la PKC es tan diferente; sin embargo aún queda mucho por explorar antes de poder proponer un esquema específico para cada receptor en el que se integre la participación de las distintas proteínas reguladoras que seguramente participan tanto en el proceso de desensibilización homóloga como en el de desensibilización heteróloga. Hasta ahora, se ha demostrado que la coexpresión de GRK2 y GRK3, en células transfectadas en conjunto con el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, se correlaciona estrechamente con la fosforilación de éste, inducida por activación homóloga (Diviani, *et al* 1996).

**f) Predicciones a partir de la estructura primaria de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.**

La comparación de la estructura primaria de los receptores estudiados puede proveer de información relevante, que ayude a explicar las diferencias encontradas en cuanto a su actividad y regulación. Al utilizar el programa BLITZ, para detectar similitudes en la secuencia primaria de las regiones intracelulares de los subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, se encontró que las diferencias mayores se localizan en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo-terminal; conviene destacar que esas regiones han sido responsabilizadas del acoplamiento a las proteínas G y en ellas, junto con la segunda asa intracelular, se encuentran los posibles sitios blanco de fosforilación, que en otros receptores han sido postulados como necesarios para modular la desensibilización. También, resulta relevante que en el extremo carboxilo-terminal, en la región que se extiende inmediatamente después de la membrana, existe un parecido razonable entre los tres receptores, el cual se pierde al encontrarse un sitio de posible palmitoilación seguido de un motivo rico en argininas que esta presente en los subtipos  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$  y que está ausente en el subtipo  $\alpha_{1a}$ . La palmitoilación es una modificación post-traducciona dinámica que al estar presente en la región mencionada estaría creando una cuarta asa intracelular y que, en otros receptores, particularmente el  $\beta_2$  adrenérgico, se ha demostrado que regula la disponibilidad del receptor a ser fosforilado y por ende

desensibilizado; de hecho, en este receptor, en el que por mutagénesis dirigida se ha omitido el sitio de probable palmitoilación, muestra un incremento drástico en la fosforilación basal y parece estar permanentemente desensibilizado, lo que indicaría que la interacción del extremo carboxilo terminal con la membrana es importante en este receptor para mantener un estado activo (Moffet, *et al*, 1993). Por otro lado, regiones ricas en aminoácidos cargados positivamente se encuentran en proteínas de la familia de la cinasa Src, en las que estos dominios intervienen en la asociación de estas proteínas con la membrana celular, en cuya cara interna es conocida la abundancia de fosfolípidos de carga negativa (Resh, 1994).

Así pues, las diferencias señaladas en la estructura primaria de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos podrían indicar diferencias en la modulación de su actividad y regulación, de manera similar al proceso equivalente que ha sido descrito en otras proteínas. En este sentido, resultaría interesante investigar la posible palmitoilación de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos y la posible influencia de esta modificación post-traducciona, junto con la presencia adyacente de un dominio polibásico, que podría reforzar la interacción del segmento carboxilo terminal de éstos con la membrana, en la regulación ejercida por la PKC que ha sido demostrada en este estudio. Para el caso concreto del receptor adrenérgico del subtipo  $\alpha_{1a}$ , recientemente se informó de la existencia de variantes que por "splicing" alternativo muestran diferencias en el extremo carboxilo-terminal, agregando con ello un potencial mayor de diversificación en cuanto a la regulación de estos receptores se refiere (Hirasawa, *et al*, 1995). Desde luego, aún cuando el análisis de la secuencia de los receptores estudiados sugiere predicciones interesantes en cuanto a su posible regulación diferencial, una exploración directa de estas predicciones es por supuesto necesaria para profundizar en el conocimiento del proceso de desensibilización.

**g) Fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico.**

El hallazgo más relevante, mostrado en el segundo manuscrito, que forma parte de los resultados de esta tesis, es la demostración de que la activación del receptor para

endotelina, expresado endógenamente en las células Rat-1, provoca la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico transfectado. Además se confirmó el incremento en la fosforilación de este receptor por activación del mismo con norepinefrina y por activación de la PKC con ésteres de forbol.

El efecto de la endotelina depende de la dosis agregada de esta hormona y sigue un curso temporal aún más rápido al que se registra por estímulo directo del receptor adrenérgico con norepinefrina; además de que puede ser bloqueado por el antagonista BQ-123, específico del receptor  $ET_A$ , que es el subtipo presente en estas células.

El receptor para endotelina forma parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G y, al igual que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, su activación modula positivamente a la vía de recambio de fosfoinosítidos-calcio a través de su acoplamiento con una proteína G, insensible a la toxina pertussis. Este receptor estimula, además, a otras vías de transducción, en una forma que sugiere su acoplamiento a distintas proteínas G. Evidencia de ello es que algunas de sus acciones son bloqueadas por la toxina pertussis. En las células Rat-1, la endotelina estimula a la vía de fosfoinosítidos-calcio, involucrando la activación de la fosfolipasa  $C\beta$ , con la participación de una proteína  $G\alpha_q$ ; además induce la fosforilación de distintas proteínas celulares en residuos de tirosina y es portadora de un estímulo mitogénico, sensible a la depleción de las formas de PKC, que desaparecen ante la presencia crónica del PMA.

Recientemente, se ha descrito que la endotelina, al estimular al receptor  $ET_A$  en las células Rat-1, provoca, de alguna manera que aún no resulta clara, la fosforilación en residuos de tirosina del receptor para factor de crecimiento epidérmico, mostrando un ejemplo claro de transmodulación positiva, ya que el receptor mencionado, al ser fosforilado, se asocia a proteínas accesorias que indican que ha sido activado. Así pues, conociendo que el receptor para endotelina es capaz de modular la actividad de algunos receptores acoplados a otras vías de transducción, y habiendo demostrado que influye

positivamente en el estado de fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico. Se investigó de que vía se sirve para alcanzar el efecto observado. Se mencionó anteriormente que el receptor  $ET_A$  estimula la actividad de cinasas que actúan sobre residuos de tirosina y, por otro lado, es conocida su habilidad para incrementar la actividad de la proteína cinasa C; así que se utilizaron inhibidores específicos para cada una de las cinasas mencionadas y los resultados obtenidos sugieren que aparentemente ambas intervienen en la fosforilación del receptor. El empleo de genisteína para bloquear la actividad de cinasas de tirosina, que pudieran estar implicadas y el de estaurosporina para inhibir a la PKC, disminuyó el efecto de la endotelina entre un 40 y un 60 por ciento, dependiendo de la concentración empleada. Estos datos sugieren que los dos tipos de cinasas actúan a través de vías independientes.

Como se mencionó líneas arriba, el receptor para endotelina, cuando es activado, transmodula positivamente al receptor para factor de crecimiento epidérmico. Para investigar si el efecto que encontramos sobre el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico era mediado por la activación del receptor para el factor de crecimiento antes mencionado, los fibroblastos Rat-1 fueron estimulados directamente con una concentración máxima de factor de crecimiento epidérmico y en estos experimentos no se evidenció incremento importante en la fosforilación basal del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, por lo que se descarta la intervención de esta vía en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, que resulta de la activación del receptor a endotelina.

Quedan por determinar los sitios en que el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico es fosforilado como respuesta a los distintos estímulos (norepinefrina, PMA y endotelina). Las diferencias en la intensidad de la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, detectadas ante cada uno de los agentes mencionados, permiten sugerir que quizá los sitios sujetos a fosforilación son diferentes o bien que algún agente induce la fosforilación en mayor número de sitios que otro. Esto permite especular que el efecto regulador que ejercen las distintas fosforilaciones pudiera ser diferente.

#### **h) Perspectivas.**

Las diferencias detectadas en la actividad y regulación de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos podrían servir de marco para contribuir a explicar la razón de su diversidad. El conocimiento de la regulación de estos receptores es fundamental para el diseño de agentes terapéuticos específicos útiles en el tratamiento de patologías en las que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos pudieran estar implicados.

La regulación que el receptor para endotelina ejerce sobre el receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico abre la posibilidad de que otros receptores, acoplados a los mismos sistemas de transducción, pudieran ejercer un efecto similar. Entre los receptores de este tipo que están presentes en los fibroblastos Rat-1 están aquellos para trombina y ácido lisofosfatídico. Otros receptores, también acoplados a la vía de recambio de fosfoinosítidos y que pueden coincidir con el receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico, son por ejemplo: los receptores para angiotensina y vasopresina en los hepatocitos.

Así pues, podría especularse que ante una serie de señales simultáneas, una célula puede responder a aquellas de acción más rápida e incluso bloquear a las restantes. De acuerdo a los resultados aquí presentados, se podría sugerir que en una célula que se enfrente simultáneamente a endotelina y a norepinefrina, o bien a ambas hormonas en orden secuencial, la respuesta a norepinefrina quizá sería bloqueada rápidamente por la acción de los receptores para endotelina. Incluso, se abre la posibilidad del uso terapéutico de la endotelina para el control de las acciones  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicas, en aquellos tipos celulares que coexpresan ambos tipos de receptores y en los que la actividad del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico estuviera asociada con alguna patología. Esto es particularmente interesante si se considera que a la fecha no existen agentes terapéuticos específicos para cada uno de los subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos, y que el uso de agentes no específicos de subtipo puede tener efectos secundarios importantes.

## **XV. CONCLUSIONES.**

Los resultados de esta tesis muestran que los diferentes subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos difieren en su habilidad para estimular a la vía de recambio de fosfoinosítidos-calcio y en su sensibilidad para ser bloqueados por la activación de la PKC. Además, se corroboró que el subtipo  $\alpha_{1b}$  es fosforilado en respuesta a norepinefrina y ésteres de forbol y se demostró que la activación de receptores para endotelina conduce a un incremento importante en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico, el cual parece estar mediado tanto por la PKC como por cinasas que actúan en residuos de tirosina. La fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico resultó independiente de la inhibición de las proteínas G sensibles a la toxina pertussis. Estos resultados apoyan la idea de que la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico modula su actividad.

**XVI. REFERENCIAS.**

- Alaluf, S, *et al*, 1995. FEBS Lett 367:301-305.
- Alberts, B, *et al*, 1994. Molecular Biology of the Cell, 3a ed; Garland New York, cap 15.
- Alblas, *et al*, 1995. J Biol Chem 270(15):8944-8951.
- Ali, H, *et al*, 1994. J Biol Chem 269(40):24557-24563.
- Allen, LF, *et al*, 1991. Proc Natl Acad Sci USA 88:11354-11358.
- Bar-Sagi, D, *et al*, 1988. J Cell Biol 106:1649-1658.
- Baass, PC, *et al*, 1995. Trends in Cell Biol 5:465-470.
- Baldwin, JM, 1994. Curr Opin Cell Biol 6:180-190.
- Banno, Y, T Sakai y Y Nozawa, 1993. Biochem J 292(Part 2):401-408.
- Baumgold, J, BB Cooperman y TM White, 1989. Neuropharmacology 28(11):1253-1261.
- Benovic, JL, *et al*, 1986. Proc Natl Acad Sci USA 83:2797-2801.
- Benya, RV, *et al*, 1995. J Biol Chem 270:3346-3352.
- Boekhoff, I, *et al*, 1994. J Biol Chem 269(1):37-40.
- Bong-Lee, S, *et al*, 1993. J Biol Chem 268(34):25952-25957.
- Bong-Lee, S y SG Ree, 1995. Curr Op Cell Biol 7:183-189.
- Bourne, H, 1995. Nature 376:727-729.
- Burgering, BMT y JL Bos, 1995. Trends Biochem Sci 20:18-22.
- Casey, PJ, 1994. Curr Opin Cell Biol 6:219-225.
- Clapham, DE, 1995. Cell 80:259-268.
- Cohen, GB, R Ren y D Baltimore, 1995. Cell 80:237-248.
- Cooper RH *et al* 1985. J Biol Chem 260:3281-3288.
- Corvera, S y JA García-Sáinz, 1984. Biochem Biophys Res Comm 119:1128-1133.
- Corvera, S, *et al*, 1986. J Biol Chem 261:520-526.
- Cotecchia, S, *et al*, 1988. Proc Natl Acad Sci USA 85:7159-7163.
- Cotecchia, S, *et al*, 1992. J Biol Chem 267(3):1633-1639.
- Crespo, P, *et al*, 1994. Nature 369:418-420
- Chabre, O, *et al*, 1994. J Biol Chem 269(8):5730-5734.



- Charbonneau, H y NK Tonks, 1992. *Annu Rev Cell Biol* 8:463-493.
- Chen, Ch, *et al*, 1995. *Molecular Pharmacol* 39:39-47.
- Chen, LQ, *et al*, 1995. *J Biol Chem* 270(52):30980-30988.
- Chen, Y, *et al* 1996. *EMBO J* 15(5):1037-1044.
- Chuang, TT, H LeVine, y A DeBlasi, 1995. *J Biol Chem* 270(31):18660-18665.
- Dasso, LLT y CW Taylor, 1992. *Mol Pharmacol* 42:453-457.
- Di Guglielmo, GM, *et al*, 1994. *EMBO J* 13:4269-4277.
- Dianing, W, J Huiping y M Simon 1995. *J Biol Chem* 270(17):9828-9832.
- Dickenson, JM y SJ Hill, 1993. *Br J Pharmacol* 110:1449-1456.
- Diviani, D, *et al*, 1996. *J Biol Chem* 271(9):5049-5058.
- Eason, MG, SP Moreira y SB Liggett, 1995. *J Biol Chem* 270(9):4681-4688.
- Exton, JH, 1994. *Annu Rev Physiol* 56:349-369.
- Fischer, G, *et al*, 1994. *Trends Biochem Sci* 19:164-168.
- Fonseca, MI, DC Button y RD Brown, 1995. *J Biol Chem* 270:8902-8909.
- Fredericks, ZL, JA Pitcher y RJ Lefkowitz, 1996. *J Biol Chem* 271(23):13796-13803.
- García-Sáinz, JA, 1991. *NIPS* 6:169-173.
- García-Sáinz, JA, *et al*, 1992. *Biochem Biophys Res Comm* 186(2):760-767.
- García-Sáinz, JA, 1993. *Cell Signalling* 5:539-547.
- García-Sáinz, JA y M Macías-Silva, 1995. *Pharmacol Commun* 6:53-60.
- García-Sáinz, JA, 1995; *Arch Med Res* 26(3):205-212.
- García-Sáinz, JA, 1996. *Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular*. Colección: La ciencia desde México. 2a ed; SEP, FCE, CONACyT. México.
- García-Sáinz, JA y R Alcántara-Hernández, 1996. *Pharmacol Comm* 7:103-113.
- Gierschik, P y KH Jakobs, 1990. *Molecular Pharmacology of Cell Regulation*. MD Houslay y G Milligan (editores). Wiley, New York. Vol 1:67-82.
- Gilman, A, 1987. *Annu Rev Biochem* 56:615-649.
- González-Espinosa, C y JA García-Sáinz, 1992. *Biochem Biophys Acta* 1136:309-314.
- Gurevitch, VV, *et al*, 1995. *J Biol Chem* 270:720-731.
- Hamm, HE y A Gilchrist, 1996. *Curr Op Cell Biol* 8:189-196.

- Harden, TK, 1992. Adv in Second Messenger and Phosphoprotein Res 26:11-34.
- Harlan, JE, *et al*, 1994. Nature 371:168-170.
- Hawes, BE, *et al*, 1996. J Biol Chem 271(21):12133-12136.
- Hein, L, *et al*, 1994. J Biol Chem 269(44):27719-27726.
- Hirasawa, A, *et al*, 1995. FEBS Lett 363:256-260.
- Hu, ZW, *et al*, 1996. J Biol Chem 271(15):8977-8982.
- Huang, Z, Y Chen y RA Nissenson, 1995. J Biol Chem 270(1):151-156.
- Hunyady, L, *et al*, 1994. J Biol Chem 269(50):31378-31382.
- Iismaa, TP y J Shine, 1992. Curr Op Cell Biol 4:195-202.
- Inglese J, *et al*, 1993. J Biol Chem 268(32):23735-23738.
- Inglese, J *et al*, 1994. Proc Natl Acad Sci USA 91:3637-3641.
- Inglese, J, *et al*, 1995. TIBS 20:151-156.
- Ishii, K, *et al*, 1994. J Biol Chem 269:1125-1130.
- Izzo, NJ, TN Tulenko y WS Colucci, 1994. J Biol Chem 269(3):1705-1710.
- Jaken, S, 1996. Curr Op Cell Biol 8:168-173.
- Kiley, SC y S Jaken, 1994. Trends in Cell Biol 4:223-227.
- Kim, CM, SB Dion y JL Benovic, 1993. J Biol Chem 268(21):15412-15418.
- Koch, WJ, *et al* 1994. Proc Natl Acad Sci USA 91:12706-12710.
- Kozasa, T y AG Gilman, 1996. J Biol Chem 271(21):12562-12567.
- Kurose, H y RJ Lefkowitz, 1994. J Biol Chem 269:10093-10099.
- Lattion, AL, D Diviani y S Cotecchia, 1994. J Biol Chem 269(36):22887-22893.
- LePretre, N, J Mironneau y JL Morel, 1994. J Biol Chem 269(47):29546-29552.
- Lederer, ED, *et al*, 1993. Cell Signalling 5(6):735-745.
- Lee, NH y CM Fraser, 1993. J Biol Chem 268(11):7949-7957.
- Lee SB, *et al* 1993. J Biol Chem 268(34):25952-25957.
- Leeb-Lundberg, LMF, *et al*, 1985. Proc Natl Acad Sci USA 82:5651-5655.
- Leeb-Lundberg, LMF, *et al*, 1987. J Biol Chem 262:3098-3105.
- Lefkowitz RJ, 1993. Cell 74:409-412
- Lev, S *et al*, 1995. Nature 376:737-745.

- Linder, ME, *et al*, 1993. Proc Natl Acad Sci USA 90:3675-3679.
- Linsbury, KM, P Casey, J Brass, y DR Manning, 1991. J Biol Chem 266:22051-22056.
- Liu, M y MI Simon, 1996. Nature 382:83-87.
- Liu WW, RR Mattingly y JC Garrison. 1996. Proc Natl Acad Sci USA 93:8258-8263.
- Lohse, MJ, *et al*. 1990. Science 248:1547-1550.
- Lohse, MJ, 1993. Biochem Biophys Acta 1179:171-188.
- Lomasney, JW *et al*, 1991. J Biol Chem 266(10):6365-6369
- Lynch CJ *et al* 1985. J Biol Chem 260:2844-2851.
- Malarkey, K, *et al*, 1995. Biochem J. 309:361-375.
- Marshall, CJ, 1995. Cell 80:179-185.
- Massagué, J, L Attissano y J Wrana, 1994. Trends Cell Biol 4:172-178.
- Milano, C, *et al* 1994. Proc Natl Acad Sci USA 91:10109-10113.
- Milligan, G, 1993. TIPS 14:413-418.
- Milligan, G, PS Svoboda y CM Brown, 1994. Biochem Pharmacol 48(6):1059-1071.
- Milligan, G, M Parenti y AI Magee, 1995. TIBS 20:181-186
- Minneman, KP y TA Esbenshade, 1994. Ann Rev Pharmacol Toxicol 34:117-133.
- Minneman, KP, *et al*, 1994. Mol Pharmacol 46:929-936.
- Miyazaki, S, 1995. Curr Op Cell Biol 7:190-196
- Mochly-Rosen, D, *et al*, 1990. Mol Biol Cell 1:693-706.
- Mochly-Rosen, D, 1995. Science 268:247-251
- Moffet, S, *et al*, 1993. EMBO J 12(1):349-356.
- Moore, RH, *et al*, 1995. J Cell Science 108:2983-2991.
- Mullaney, I, *et al*, 1993. Biochem J. 289:125-131.
- Mumby, SM, C Kleuss y AG Gilman, 1994. Proc Natl Acad Sci USA 91:2800-2804.
- Muntz, KH *et al*, 1992. Mol Biol of the Cell 3:49-61.
- Nakanishi, H, KA Brewer y JH Exton, 1993. J Biol Chem 268(1):13-16.
- Nakata, H, *et al*, 1994. Eur J Biochem 220:29-36.
- Nantel, F, *et al*, 1993. Mol Pharmacol 43:548-555.
- Neer, EJ, 1995. Cell 80:249-257.

- Nishizuka, Y, 1995. FASEB J 9:484-496.
- Nobes, C y A Hall, 1995. Cell 81:53-62.
- Opperman, M, *et al*, 1996. J Biol Chem 271(22):13266-13272.
- Parruti, G. *et al*, 1993. J Biol Chem 268:9753-9761.
- Pérez, DM, MT Piascik y RM Graham, 1991. Mol Pharmacol 40:876-883
- Pérez, DM, MB de Young y RM Graham, 1993. Mol Pharmacol 44:784-795.
- Pippig, S, S Andexinger y MJ Lohse, 1995. Mol Pharmacol 47:666-676.
- Pitcher, J, *et al*, 1992. Biochemistry 31(12):3193-3197.
- Pitcher, JA, *et al*, 1995. J Biol Chem 270(20):11707-11710.
- Premont, RF, *et al*, 1994, J Biol Chem 269 (9):6832-6841.
- Premont, RF, J Inglese y RJ Lefkowitz, 1995. FASEB J 9:175-182.
- Pumiglia, KM, *et al*, 1995. J Biol Chem 270(24):14251-14254.
- Resh, MD, 1994. Cell 76:411-413.
- Robles-Flores, M y JA García-Sánz, 1994. Biochem Mol Biol Intl 34(3):465-473.
- Rokosh, DG *et al*, 1996. J Biol Chem 271(10):5839-5843.
- Ron, D, *et al*, 1994. Proc Natl Acad Sci USA 91:839-843.
- Schlessinger y Ullrich, 1992. Neuron 9:383-391.
- Schwinn, DA, *et al*, 1990. J Biol Chem 265(14):8183-8189.
- Schwinn, DA, *et al*, 1991. Mol Pharmacol 40:619-626.
- Sivilotti, L y D Colquhoun, 1995. Science 269:1681-1682.
- Sibley, DR *et al*, 1987. Cell 48:913-922.
- Smith, WC, *et al*, 1994. J Biol Chem 269:15407-15410.
- Smrcka, AV, *et al* 1991. Science 251:804-807.
- Smrcka, AV y PC Sternweis 1993. J Biol Chem 268(13):9667-9674.
- Spiegel, AM, 1992. Curr Op Cell Biol 4:203-211
- Sternweis, PC, 1994. Curr Op Cell Biol 6:198-203.
- Sterne-Marr, R. *et al*, 1993, J Biol Chem 268:15640-15648.
- Stoffel, RH, *et al*, 1994. J Biol Chem 269(45):27791-27794.
- Strasheim, D y CC Malbon, 1994. J Biol Chem 269(19):14307-14313.

- Svoboda, P y G Milligan, 1994. Eur J Biochem 224:455-462.
- Taylor, SJ, *et al*, 1991. Nature 350:516-518.
- Tholanikunnel, BG, JG Granneman y CC Malbon, 1995. J Biol Chem 270(21):12787-12793
- Thomas *et al*, 1995. J Biol Chem 270(1):207-213.
- Thonberg, H, *et al*, 1994. J Biol Chem 269(52):33179-33186.
- Tobin, AB y S Nahorski, 1993. J Biol Chem 268:9817-9823.
- Touhara, K, *et al*, 1994. J Biol Chem 269(14):10217-10220.
- van Biesen, T *et al*, 1995. Nature 376:781-784.
- Wedegaertner, PB y HR Bourne, 1994. Cell 77:1063-1070.
- Wells, A, *et al*, 1990. Science 247:962-964.
- Wilkinson, SE y TJ Hallam, 1994. Trends in Pharmacol Sci 15:53-57.
- Wilson, 1994. Trends in Cell Biol 4:409-414.
- Willars, GB y SR Nahorski, 1995. Mol Pharmacol 47:509-516.
- Winstel, R *et al*, 1996. Proc Natl Acad Sci USA 93:2105-2109.
- Wise, A, *et al*, 1995. J Biol Chem 270:17196-17203.
- Wojcikiewicz, RJH, AB Tobin y SR Nahorski, 1993. TIPS 14:279-285.
- Zhang, J, *et al*, 1996. J Biol Chem 271(31):18302-18305.
- Zhu, SJ, *et al*, 1996. Eur J Pharmacol 299:205-212.
- Ziemięcki, A, AG Harpur y AF Wilks, 1994. Trends in Cell Biol 4:207-212.