

00562

3

24'

MODULACION DE LA RESPUESTA  $\alpha_2$ -ADRENERGICA EN PLAQUETAS POR

ESTERES DE FORBOL

QUE PRESENTA LA BIOLOGA

GLORIA GUTIERREZ VENEGAS.

Para optar por el grado de Maestría en Ciencias Químicas

( B I O Q U I M I C A )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



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.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
OBJETIVOS .....	38
MATERIALES Y METODOLOGIA .....	39
RESULTADOS .....	41
RESUMEN DE RESULTADOS .....	42
DISCUSION .....	44
BIBLIOGRAFIA .....	52

## ABREVIATURAS

AMPC	adenosin 3,5 monofosfato cíclico.
ATP	adenosin trifosfato.
Ri	receptor inhibitorio.
Rs	receptor estimulador.
Gs	proteína fijadora de nucleótidos acoplada de manera estimuladora.
Gi	proteína fijadora de nucleótidos acoplada de manera inhibitoria a la adenilato ciclase.
Gpp(NH)p	guanilil imido difosfato.
GTP	guanosin trifosfato.
IP <sub>3</sub>	fosfatidil inositol 4,5 bifosfato.
PLC	fosfolipasa C.
PKC	proteína cinasa C.
TPA	12 tetradecanoil forbol-130-acetato.
PAF	factor activador de plaquetas.
PGE <sub>1</sub>	prostaglandina E <sub>1</sub>

## RESUMEN

La actividad de la adenilato ciclasa es modulada por las proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina. La activación de los receptores alfa<sub>2</sub>adrenérgicos de plaquetas, provoca la inhibición de la adenilato ciclasa y como resultado un decremento en los niveles de AMPc vía activación de Gi.

En el presente trabajo utilizando el 4-forbol-13-acetato miristato (TPA), agente que activa directamente a la proteína cinasa C, y que nos permite manipular la respuesta de la cinasa independientemente de la estimulación hormonal. Se observó que se bloquea la inhibición del sistema de la adenilato ciclasa por epinefrina y otros agentes como trombina y factor activador de plaquetas (PAF). Se observó también que al activar directamente a la adenilato ciclasa con forskolina en membranas de plaqueta tratadas con TPA se presentaban incrementos en la actividad de la enzima, lo que sugería que algunos de los componentes del brazo inhibitorio de la adenilato ciclasa se alteraba por la acción de la proteína cinasa C.

Se encontró así mismo que la inhibición causada por análogos del GTP (Gpp(NH)p) no perdían efectividad en las membranas de plaquetas tratadas con TPA, lo que sugería que la interacción entre la proteína Gi y la adenilato ciclasa no se alteraba por la acción de la proteína cinasa C.

Realizando estudios de asociación con Yohimbina se vió que el tratamiento con TPA no alteraba las curvas de saturación, lo que nos mostró que no existían diferencias entre el número de sitios disponibles ni en su afinidad por el antagonista en las membranas control ni en las membranas de plaquetas tratadas con TPA. Sin embargo en estudios de competencia con epinefrina se encontró que en las membranas control el Gpp(NH)p causaba un desplazamiento hacia la derecha en la curva, mismo que no se presentaba en las membranas de plaqueta tratadas con TPA. Lo anterior nos sugirió que la activación de la proteína cinasa C con TPA altera la interacción del receptor con la proteína Gi.

A continuación se procedió a caracterizar la modulación hormonal en la actividad de GTPasa y se detectó una disminución en la respuesta a epinefrina en membranas de plaqueta tratadas con TPA, de manera dependiente de la dosis y del tiempo. Se encontró además en estudios de ADP-ribosilación con toxina petussis que la ADP-ribosilación de Gi disminuía en las membranas de plaqueta tratadas con TPA.

En otra fase de la investigación se generaron anticuerpos dirigidos contra el decapeptido del carboxilo terminal de alfa-Gi<sub>2</sub>, los cuales se utilizaron para efectuar estudios in vivo de fosforilación e inmunoprecipitación. Nuestros datos muestran una proteína fosforilada en las plaquetas a la que se les activó la proteína cinasa C con TPA, de un peso molecular de 41 Kda, correspondiente al peso molecular de alfa Gi<sub>2</sub>. Así mismo

en el inmunoblott, se encontró una disminución en el reconocimiento de alfa-Gi<sub>2</sub> por el tratamiento con TPA.

Nuestros datos sugieren, a fin de cuentas, que la activación de la proteína cinasa C con ésteres de forbol en plaquetas, bloquean la inhibición de la adenilato ciclasa, afectan la interacción entre el receptor y la subunidad alfa de Gi y disminuyen la actividad de GTPasa de Gi, lo que ocurre quizá por fosforilación o degradación de alfa-Gi.

## INTRODUCCION

La vida, antes que nada, es un vasto sistema de señales. Desde los organismos más simples hasta los animales superiores, todo, en esencia, depende de la comunicación. La célula, que es la unidad primordial del mundo vivo, no podría superar los desafíos del medio ambiente si no fuera por su infinita capacidad de poner en contacto de manera permanente e instantánea a cada una de sus partes con el resto de todas ellas. Este portento de la naturaleza se produce mediante la emisión de señales químicas que viajan por todos los rincones del ámbito celular promoviendo respuestas que a su vez promueven nuevas señales y nuevas respuestas de cuyo balance y armonía depende en último grado la sobrevivencia del organismo.

La primera línea de recepción y transmisión de señales está situada en la superficie de la membrana celular y se compone de una serie de estructuras proteínicas llamadas receptores, los que están encargados de recibir los mensajes del mundo externo y enviarlos al interior de la célula convertidos a su vez en nuevos mensajes. La biología moderna ha convenido en darle a tales señales el nombre de mensajeros químicos, que son las moléculas de cuyo desplazamiento riguroso y oportuno dependen las funciones esenciales del metabolismo.

Los mensajes propiamente dichos se originan en una serie de células emisoras que envían sus productos de secreción hacia unos órganos específicos, denominados órganos blanco, donde se encuentran los receptores equipados con la estructura adecuada para captar e interpretar las señales del exterior. Las células emisoras, a su vez, pertenecen a dos grandes sistemas de intercomunicación que reciben el nombre de sistema endócrino y nervioso, cuya capacidad de respuesta se halla determinada genéticamente en cuanto a la velocidad y la especificidad de sus resultados. Los mensajes endócrinos son más lentos que los nerviosos y se hallan sujetos a una estrategia de coordinación que les permite ir ejerciendo sus efectos de una manera tan escalonada como gradual(1). Estas moléculas, que en adelante llamaremos mensajeros químicos, suelen ponerse en contacto con muchas clases de células en diversos tejidos, pero sólo algunas de ellas serán capaces de reaccionar en forma específica ante el estímulo del mensaje.

Los investigadores han establecido varios criterios para clasificar la naturaleza de los mensajeros a fin de situarlos en un marco de referencia inequívoco. El primero de ellos se refiere a la distancia que deben recorrer los mensajeros antes de llegar a la célula donde habrán de ejercer su efecto. Las vías o distancias que unos y otros deben recorrer para llegar a su punto de destino se denominan ruta endócrina, parácrina y autócrinas (2). En la primera de ellas las células de los órganos endócrinos liberan el mensajero, que es una hormona, a través, del torrente sanguíneo hasta llegar a su blanco. En la



segunda la célula que libera la señal actúa en células cercanas o adyacentes, como la transmisión de un impulso eléctrico en células nerviosas, las que liberan una serie de compuestos químicos llamados neurotransmisores. En la última de ellas, que es la autócrina, la célula responde a señales que ella misma libera, como los factores de crecimiento.

Los mensajeros pueden estudiarse también desde el ángulo puramente químico. En este caso los investigadores han logrado establecer tres categorías básicas de clasificación, mismas que responden en forma rigurosa a sus estructuras esenciales y a sus formas de operar en el organismo. La primera gran categoría agrupa en su seno a los mensajeros de origen lipídico, que interaccionan con receptores intracelulares, como los esteroides, cuya síntesis se origina en el colesterol y que tienen, por tanto, una estructura similar a la molécula madre. Se ha pensado que estos mensajeros suelen acumularse en el núcleo y que en algunas instancias pueden intervenir en las actividades de transcripción. Su importancia se extiende también a ciertas interacciones con el RNA mensajero, cuyo rango de estabilidad podría depender de ellas en cierta medida, aunque no se ha definido con la debida claridad el papel que desempeñan en este ámbito de la estructura genética. El efecto de los esteroides tiende a ser largo, pudiendo en algunos casos llegar a extenderse por varios días. Los esteroides, además, se transportan por conducto de la sangre, lo que efectúan asociándose a unas proteínas cuya función específica consiste en servir de vehículos.

La otra categoría de mensajeros tienen una estructura peptídica o aminica y no son solubles en lípidos, lo que les otorga la facultad de interaccionar con receptores de la membrana celular. Estas hormonas incluyen polipéptidos más o menos grandes, como la insulina, y moléculas más pequeñas, como las catecolaminas, la epinefrina y la norepinefrina. Los aminoácidos también juegan un papel destacado en esta clasificación, ya que por ejemplo, el ácido glutámico, la glicina y las hormonas tiroideas pueden ejercer el efecto de mensajeros (2).

Las moléculas que hemos descrito hasta el momento tienen como propósito biológico fundamental relacionarse con un grupo de estructuras proteínicas llamados receptores, mismos que son sintetizados por la maquinaria celular con altísimo grado de especificidad. La idea del receptor surgió a la luz en 1906, cuando Langley estaba estudiando la unión mioneuronal para establecer el mecanismo activo de la nicotina y del curare y desentrañar la relación antagónica que se producía entre estos agentes, que parecían competir por el mismo sitio de unión (3,4).

Los receptores se asocian al mensajero con un grado de afinidad muy elevado, lo que se produce mediante la acción convergente de interacciones iónicas, hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. Es importante subrayar que los receptores se hallan glucosilados, lo que nos hace pensar en la estrategia de largo alcance de la célula, que no sólo selecciona los materiales de exportación con una anticipación extraordinaria

sino que ha diseñado mecanismos de identificación molecular para establecer en forma inequívoca el destino preciso de cada material exportado. Los receptores pueden estudiarse utilizando mensajeros fisiológicos como las hormonas, o bien recurriendo a una serie de fármacos que eventualmente pueden actuar como agonistas o antagonistas en el proceso de transducción. Ambas moléculas tienen la posibilidad de acoplarse al receptor, pero sólo los agonistas disponen de la conformación adecuada para activarlos y transmitir al citoplasma, a través de los sistemas de transducción, la señal que habrá de ejercer su efecto final en el propio citoplasma o bien en el núcleo, donde en algunas ocasiones desempeña funciones de regulación genética (5). Los sistemas de transducción a que se ha hecho mención han sido profusamente estudiados durante los últimos años. Sin embargo los más importantes de ellos son el sistema de transducción de la Adenilato Ciclasa y el de Fosfoinosítidos-calcio.

## EL SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA

La investigación sobre los mensajeros químicos se intensificó a principios de la década de los años cincuentas, cuando Earl Sutherland y sus colaboradores (6) empezaron a observar el efecto de la adrenalina sobre los animales vertebrados que se hallaban sometidos a una situación de emergencia. Los cambios más notables al elevarse los niveles de la hormona se centraban en el aumento de la frecuencia cardíaca, aumento de la presión sanguínea y una serie de efectos característicos, que implicaban cambios drásticos en el estado de relajamiento o de tensión de los músculos lisos. En el curso de las mismas indagaciones, que abrieron una brecha enorme en el panorama de la bioquímica moderna, el propio Sutherland se valió de unos cortes de tejido hepático para observar los efectos de la adrenalina, que al entrar en acción produjo el efecto de generar glucosa en el medio observado. Tiempo después el mismo equipo de observadores determinó por una serie de experimentos subsecuentes que el efecto más dramático de la adrenalina había consistido en aumentar la actividad de las enzimas involucradas en la degradación del glucógeno, en especial la fosforilasa, que ya había sido estudiada y caracterizada un poco antes. Sin embargo se observó también, a través de experimentos detallados, que la adrenalina no ejercía su efecto en forma directa sobre la fosforilasa, ya que al ponerla en contacto en un medio adecuado, y luego de

haber sido purificadas, la hormona se mostraba del todo ineficaz para repetir el efecto que había promovido en presencia del tejido intacto (6). La evidencia descrita los llevó a suponer (y a postular) la existencia de un factor de intermediación que debería servir de vínculo activo entre la hormona y la enzima para ejercer el efecto espectacular que se había producido en el tejido. La indagación culminó en el hallazgo de una molécula de AMP que no se hallaba en su estado químico habitual, sino ciclada, lo que se vino a comprobar por la existencia en el medio de una gran abundancia de pirofosfato y magnesio, lo que les hizo suponer una reacción enzimática, promovida por la adrenalina, en la que una molécula de ATP perdía dos fósforos antes de asumir la estructura cíclica que se había observado (7).

No pasó mucho tiempo antes de que se determinara la enzima responsable de tal reacción, misma que recibió el nombre de adenilato ciclasa (8) y que, a partir de aquellos días, representó un papel fundamental en la historia de las indagaciones bioquímicas del siglo XX. Se descubrió también que la enzima se hallaba íntimamente unida a la membrana plasmática. Al principio se pensó que el sistema mediante el cual se producía el efecto general de la hormona se hallaba compuesto, de manera muy simple, por un receptor, que estaría emplazado en la parte externa de la membrana plasmática, y una molécula de adenilato ciclasa, que estaría unida a la parte interna y que al recibir la señal se pondría a funcionar sobre el ATP del medio. Posteriormente se aclaró que la estructura

era bastante más compleja de lo que se había supuesto al principio y una serie de estudios, tan brillantes como los iniciales, empezaron a delinear el perfil verdadero de un sistema cuya importancia y belleza no ha dejado de fascinar a los investigadores desde entonces.

El esfuerzo desplegado para descifrar la estructura profunda del sistema de transducción fue uno de los más interesantes de la bioquímica moderna y sus consecuencias no han hecho sino empezar a insinuarse. Los primeros episodios de este esfuerzo arrojaron una luz decisiva sobre los componentes básicos de la estructura y aunque su diseño general ha sido dilucidado por entero también es verdad que hay una serie de mecanismos específicos que todavía están sumidos en la penumbra. Los diversos componentes de la estructura se hallan ensamblados obedeciendo a un orden estricto y no parece haber un solo paso en todo el sistema que no tenga una importancia decisiva en el funcionamiento del conjunto.

El sistema de transducción, que pasaremos a examinar en las siguientes líneas, se halla integrado, en esencia, por cinco elementos fundamentales: receptores estimulatorios, receptores inhibitorios, proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina acopladas estimulatoriamente (Gs), proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina acopladas inhibitoriamente (Gi) y la subunidad catalítica de la Adenilato Ciclasa (Fig 1). Los receptores, que atraviesan a la membrana celular de un lado a otro, tienen como función unir a los ligandos desde el exterior de la célula y activar una serie de efectores de cuya actividad

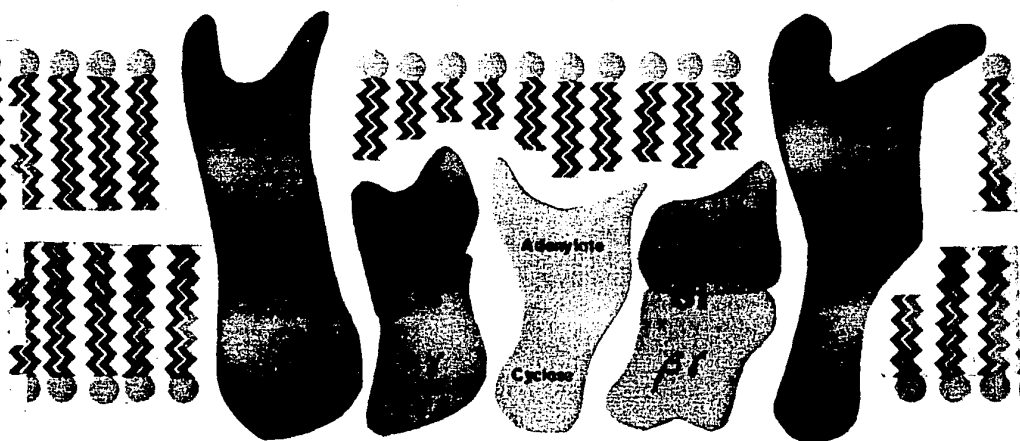


FIG 1 Modelo del sistema de la adenilato ciclasa .

*Rs* receptor estimuladorio, *Ri* receptor inhibitorio, Proteína G estimuladora ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), Proteína G inhibitoria ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), Adenilato ciclasa.

oportuna depende la generación de los segundos mensajeros, que son, en última instancia, los responsables de ejercer el efecto bioquímico de regulación metabólica.

El sistema de transducción de la adenilato ciclasa se halla provisto de receptores acoplados estimulatoriamente, como los que reciben la señal del glucagon y otros que se hallan acoplados inhibitoriamente, como los destinados a recibir la señal de la somatostatina. Sin embargo es necesario destacar la existencia de ciertas hormonas, como la epinefrina, que tienen la facultad de interaccionar en forma indistinta con ambas clases de receptores y de producir, por tanto, los diversos efectos que son característicos de cada uno de ellos. La epinefrina ejerce su efecto estimulatorio elevando los niveles de AMPc a través de los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (9) acoplados estimulatoriamente al sistema de transducción de la adenilato ciclasa y ejerce su efecto inhibitorio disminuyendo los niveles del mismo metabolito a través de los receptores  $\alpha_2$  acoplados inhibitoriamente al propio sistema. Se ha propuesto también que son capaces de activar al transportador de sodio/ protón (10).

El interés creciente por conocer más a fondo el sistema llevó a los investigadores a aislar y purificar los genes donde se hallan codificadas las proteínas que integran la secuencia total de cada uno de los receptores (11-17). El estudio de referencia evidenció que los receptores se hallan compuestos por siete dominios transmembranales que exhiben tres asas en el espacio extracelular y tres más en el intracelular. El mismo receptor presenta además siete regiones con aminoácidos



hidrofóbicos de una extensión aproximada de veinticinco residuos, mismos que son los responsables de atravesar la membrana. Una topología similar se observa en la rodopsina, que es el receptor encargado de recibir, en el ojo, las primeras señales luminicas del exterior y cuyo sistema de transducción de la luz retinal está acoplado a la proteína G-transducina y a una enzima efectora denominada fosfodiesterasa de GMPC (18).

Los receptores mencionados exhiben sitios glucosilados que se hallan insertos alrededor del extremo amino de la cadena proteínica que se encuentra en la porción extracelular. El extremo carboxilo, en cambio, se encuentra siempre en el ámbito interior de la célula. La organización de los receptores, que ha sido objeto de una exploración minuciosa durante los últimos años, no ha sido esclarecida en toda su integridad, pero los rasgos descifrados hasta la fecha permiten deducir, o imaginar, el trazo general de la estructura y utilizarla para inferir los mecanismos básicos de su funcionamiento (19-20). En 1988, por ejemplo, el equipo de Robert Lefkowitz, de la universidad de Duke, realizó una serie de complejos experimentos (21) para caracterizar los sitios de unión, para agonistas y antagonistas y los de acoplamiento a las proteínas G. El experimento incluyó el diseño de quimeras del receptor  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  adrenérgico, que fueron utilizadas para demostrar que los dominios tercero y cuarto de los receptores mencionados son los determinantes fundamentales de la asociación específica de las señales y el dominio séptimo en la asociación con el antagonista. En el curso de la citada investigación se

descubrió también que los fragmentos quinto y sexto del receptor que atraviesan la membrana, así como la tercera asa ubicada en el citoplasma, le confieren al receptor  $\beta$  la habilidad de acoplarse a la proteína fijadora de nucleótidos de guanina Gs.

Tras el descubrimiento del AMPc el grupo de Rodbell encontró en 1970 que el sistema requería de la presencia de guanosin trifosfato (GTP) para funcionar de manera eficaz (22-24), pero no fue sino en la década de los ochenta, con los trabajos de Gilman (25-26) y Birbaumer (27), cuando se logró identificar a las proteínas que tenían la capacidad de fijar a los nucleótidos de guanina, mismas que en la actualidad reciben el nombre genérico de proteínas "G". Se ha descubierto que todas ellas participan activamente en la transducción de señales hormonales y que tienen una estructura heterotrimérica constituida por las unidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en orden decreciente de peso molecular.

Hasta el día de hoy se han secuenciado de manera inequívoca doce subunidades  $\alpha$  cuyos pesos oscilan entre 39 y 52 Kdaltons (Kda.). La subunidad  $\alpha$  tiene como función reconocida la de fijar e hidrolizar GTP, que es uno de los pasos fundamentales del mecanismo general de transducción. Las proteínas G integran un grupo muy variado de especímenes, no todos los cuales han sido descritos en su totalidad, pero en la década de los ochenta se averiguó que el sistema de la adenilato ciclasa dispone de dos proteínas G, denominadas Gs y Gi, encargadas de estimular o de inhibir a la enzima cicladora. La necesidad de

establecer con máxima exactitud la ubicación del sitio encargado de ejercer el efecto estimulador llevó a los investigadores a explorar las posibilidades de la subunidad  $\alpha$ GS y se encontró que es ella quien regula de manera estimuladora, en efecto, a la adenilato ciclasa. La subunidad mencionada resultó ser también la responsable de activar los canales de calcio sensibles a la dihidropiridina (28,29). La subunidad  $\alpha$  de  $G_i$ , por su parte, es la responsable de mediar el efecto inhibitorio de la enzima. La biología molecular (30,31) y las técnicas inmunológicas (32-35) aportaron así mismo un auxilio invaluable en la descripción y caracterización de la subunidad  $\alpha$  de  $G_i$ , trabajos que permitieron agruparlas en  $\alpha G_{i1}$ , que es un polipéptido de 41 Kda que se halla en abundancia en el cerebro;  $\alpha G_{i2}$ , que es un polipéptido de 40 Kda y  $\alpha G_{i3}$ , que también es un polipéptido de 41 Kda pero con una secuencia diferente, misma que está involucrada en regular canales de potasio (36).

Las tres proteínas mencionadas han sido localizadas en un mismo tipo celular, el eritrocito, pero su heterogeneidad funcional no ha sido esclarecida por completo, aunque se ha supuesto que  $\alpha G_{i2}$  es la responsable de inhibir a la adenilato ciclasa (34). Otras evidencias, sin embargo, sugieren que al disociarse  $\alpha$  de  $\beta\gamma$  se incrementa la concentración de ésta última dejando al complejo  $\beta\gamma$  en posibilidad de asociarse a  $\alpha$ GS y bloquear en forma simultánea la activación de la ciclasa (27,39). Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  forman un complejo de alta afinidad y pueden separarse unas de otras solo en condiciones

desnaturalizantes. Los complejos  $\beta\gamma$  de  $G_s$  y  $G_i$  se pueden intercambiar, lo que hace suponer que las diversas subunidades  $\alpha$  comparten en algún momento la funcionalidad de todo el complejo (FIG. 2). Además de hidrolizar GTP por su actividad de GTPasa las proteínas G fijan también iones de magnesio y flúor, lo que acelera su proceso de activación, aunque hasta la fecha no se ha desentrañado de manera precisa la forma en que los iones interactúan con las proteínas para dejarlas en la posibilidad de intervenir en los pasos siguientes de la transducción (8).

Durante el proceso de transducción de las señales biológicas se producen una serie de fenómenos consecutivos, y otros simultáneos, de cuya puntualidad depende la exactitud con que el estímulo ejercerá su efecto final. En los renglones que siguen se hará una descripción sumaria de algunos de ellos, en especial de los cambios operacionales que se observan en torno a las proteínas G, que según se ha dicho un poco antes, son las partes del sistema encargadas de hidrolizar los nucleótidos de guanina, paso determinante en el desarrollo general de la transducción.

En los momentos previos a la aparición del estímulo las proteínas G se encuentran estables en su condición trimérica original. El fragmento  $\alpha$  permanece asociado a una molécula de GDP y el receptor correspondiente se halla en contacto inmediato con la proteína G y en un estado de alta afinidad para recibir al agonista (Ra). En estas circunstancias se ha formado por tanto un complejo entre el receptor, que se halla en

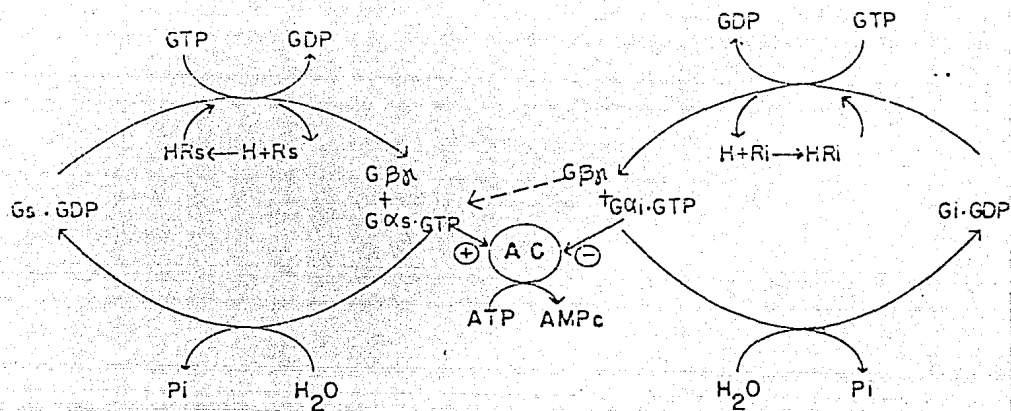


FIG. 3 Modelo cinético para la activación de la adenilato ciclasa.

Receptor en estado de alta afinidad (Ra); Receptor en estado de baja afinidad (Rb); Proteína fijadora de nucleótidos de guanina acoplada de manera estimuladora (Gs); Subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ; Adenilato ciclasa (AC).

su máximo estado de afinidad, y la proteína G, provista de la mencionada molécula de GDP (Ra-G-GDP). Cuando el agonista se une al complejo el GDP es substituido por GTP, en lo que es el primer movimiento significativo del sistema en cuestión. En ese momento el agonista, que ya ejerció su efecto, es liberado para actuar otra vez sobre algún otro receptor o bien para ser degradado. Una vez efectuado este primer paso el receptor pierde su estado de afinidad y adopta uno de baja afinidad, en virtud de que se ha disociado de la proteína G en esta primera fase de la transducción. Por otra parte la misma proteína, una vez disociada, se activa mediante la separación de la subunidad  $\alpha$  al separarse del complejo  $\beta\gamma$ ;  $\alpha$ -GTP, por su lado, es capaz en este nuevo estado de activar a la adenilato ciclasa. Como se mencionó anteriormente la subunidad  $\alpha$  es el miembro del sistema cuya virtud fundamental es la de ejercer funciones de GTPasa, hidrolizando el GTP a GDP. Una vez efectuado el paso anterior la subunidad  $\alpha$ -GDP tendrá la facultad de asociarse al complejo  $\beta\gamma$  y al receptor que ahora se encuentra en estado de baja afinidad, formando un nuevo complejo que ahora denominaremos receptor en baja afinidad G-GDP, que estará listo de nueva cuenta para interaccionar con el siguiente agonista. (FIG.3) (38-41)

Las proteínas G son sustrato de ciertas toxinas bacterianas que poseen actividad de ADP ribosil transferasa, como la toxina pertussis, producida por la Bordetella pertussis y la toxina del cólera, producida por el Vibrio cholerae. Ambas toxinas, que son agentes causales, respectivamente, de la

tosferina y del cólera han sido una herramienta muy valiosa para caracterizar a las proteína G. Las toxinas, además, catalizan una modificación covalente en las proteínas G, lo que efectúan valiéndose de NAD para hacer la transferencia de una molécula de ADP-ribosa.

La toxina del cólera tiene la propiedad de ADP-ribosilar a la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs (42), lo que promueve la disociación del complejo  $\beta\gamma$  y de esta manera la subunidad de referencia se queda permanentemente activada y actuando sobre la adenilato ciclasa. La toxina pertussis, que no es menos efectiva, ADP ribosila a la subunidad  $\alpha$  de Gi (43), reacción que se produce en un residuo de cisteína que se encuentra ubicado cerca del extremo carboxilo terminal de la proteína G. La reacción anterior permite que los receptores acoplados inhibitoriamente al sistema de la adenilato ciclasa pasen a un estado de baja afinidad. El mecanismo descrito tiene una consecuencia un tanto singular, pues la interacción de la toxina con  $\alpha Gi$  produce una alteración de tal naturaleza que le impide actuar sobre la ciclasa produciendo un efecto inhibitorio, como sería lógico en este marco de referencia, y en lugar de hacerlo la deja en un estado tal que puede seguir desplegando sus funciones originales sin ninguna interrupción. Otra manera igualmente certera de activar a las proteínas G es utilizando análogos no hidrolizables del GTP, como el Gpp(NH)p que se une de manera irreversible a la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G, que a su vez ejerce sus efectos sobre la adenilato ciclasa (44) .

El último elemento integrado al sistema de la adenilato ciclasa, es la propia enzima, que tiene como función cardinal hidrolizar al ATP y formar AMPc. La estructura de la enzima permaneció indeterminada durante mucho tiempo, hasta que en la década de los ochentas con los experimentos de Pfeuffer y colaboradores, lograron purificar a la enzima en miocitos de conejo y posteriormente R.S Salter y otros investigadores (44-47) la obtuvieron a partir de membranas de cerebro. Con estos trabajos, se vio entonces que era una proteína de gran tamaño, pues tenía un PM de 150 Kda cuya activación depende también de la calmodulina, una proteína diseñada para captar el calcio del medio celular. La adenilato, además, puede ser activada así mismo con ciertos fármacos, como la forskolina, que es un diterpeno aislado de la planta Coleus forskohlii.

La formación del AMPc, móvil básico de todo el sistema, iniciará por su parte una cadena de reacciones entre las que, la activación de la proteína Cinasa A es uno de sus efectos primordiales. Si es verdad que la acción hormonal incrementa de manera notable los niveles de AMPc también es necesario subrayar que existe en torno al sistema una fosfodiesterasa que se encarga de catalizar la hidrólisis del AMPc a AMP lineal haciendo bajar de nuevo los niveles del AMPc y dejando a la célula en aptitud de reaccionar ante una nueva señal (48).



## SISTEMA DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO

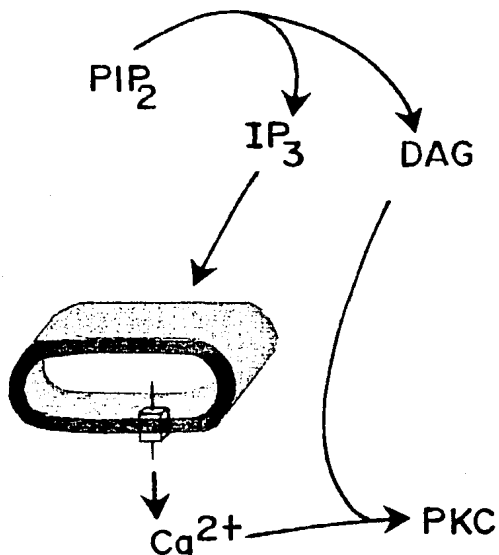
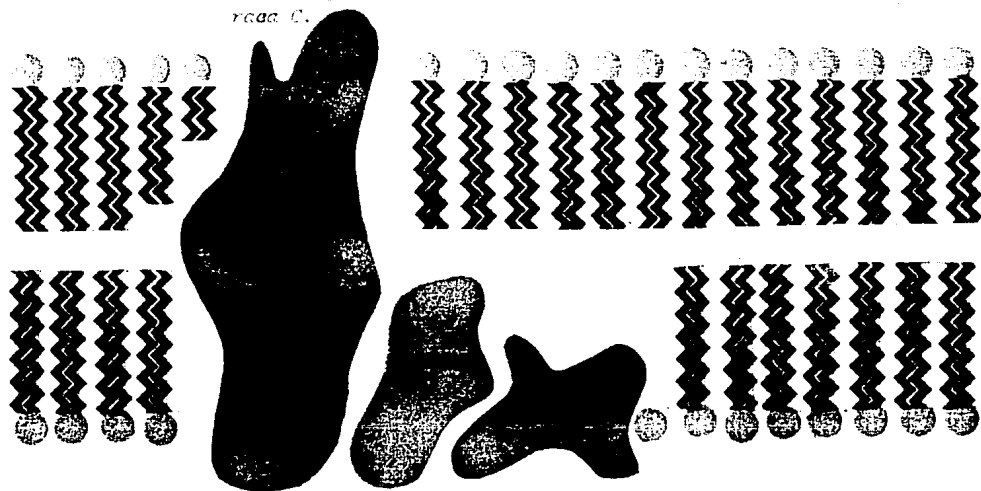
Hacia 1953, mientras trabajaban en la universidad de Ohio, M.R Hokin y L.E Hokin (49) observaron que la acción de la acetilcolina inducía la incorporación de fósforo 32 al fosfatidil inositol y al ácido fosfatídico, que son los intermediarios fundamentales del sistema de transducción denominado Fosfoinosítidos-Calcio. Posteriormente, en la década de los setenta, R.H Mitchel (50) propuso la existencia de un nuevo mecanismo de transducción que involucraba el recambio de fosfoinosítidos. Un poco antes, sin embargo, J. Durrel y sus colaboradores (51) habían propuesto ya la función hipotética de los fosfoinosítoles en respuesta a la estimulación de los receptores membranales. Por su lado Micheal Berridge (52) demostró en fecha reciente que el inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) es uno de los productos de la hidrólisis del Fosfatidil-Inositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>). La enzima responsable de catalizar la hidrólisis de fosfoinosítidos en el curso de este proceso es la fosfolipasa C. Observaciones hechas durante ese mismo tiempo evidenciaron que el IP<sub>3</sub> se halla íntimamente vinculado a la movilización de calcio intracelular, lo que posiblemente ocurre en el retículo endoplasmático (53-55). En la actualidad, y como consecuencia de las indagaciones mencionadas, se ha venido a determinar que el sistema está constituido por tres elementos: un receptor, una proteína

fijadora de nucleótidos de guanina (Gp,Gx) y la fosfolipasa C (FIG. 4).

Hay una serie de hormonas, como la epinefrina, la vasopresina y la angiotensina II que al asociarse a sus receptores estimulan a la fosfolipasa C originando la hidrólisis consiguiente de los fosfoinosítidos. Los receptores involucrados en esta reacción han sido estudiados también de manera muy cuidadosa y el día de hoy se sabe ya que el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, que responde a epinefrina, es una glucoproteína de 80 Kda. Se sabe también que su estructura está compuesta de 515 aminoácidos y que la molécula de DNA que da origen a la proteína mencionada es la única que ostenta un intrón, a diferencia de las que codifican a los otros receptores adrenérgicos, lo que podría, el día de mañana, y cuando se establezca la función real de los intrones, arrojar una nueva luz sobre la naturaleza específica de cada uno de los receptores. Otra diferencia significativa es que el extremo carboxilo que se asoma por la fracción intracelular es más largo en los receptores alfa 1 adrenérgicos, aunque no se ha determinado aún si esta última característica tiene alguna relevancia en la forma en que los receptores se asocian a la proteína G para iniciar la respuesta intracelular (11).

Hasta el día de hoy no se ha demostrado con la debida claridad la existencia de la proteína fijadora de nucleótidos de guanina, sin embargo hay una serie de observaciones experimentales que sugieren de manera vehemente la posibilidad de que una molécula de tales características sea la responsable

Fig. 2. Modelo sobre el mecanismo de acción de los mensajeros del sistema fosfoinosítidos celular. E receptor; Gp proteína fijadora de nucleótidos de guanina, PLC fosfolipasa C; PIP<sub>2</sub> fosfatidil inositol bisfosfato; IP<sub>3</sub> inositol trifosfato, DAG diacilglicerol; PKC proteína cinasa C.



de acoplar al receptor con la fosfolipasa C (56,57). Por otro lado se ha demostrado de manera inequívoca que la actividad de la fosfolipasa C se incrementa de manera notable por la presencia de análogos no hidrolizables del GTP en membranas de neutrófilos (58). Se ha observado también que en la glándula salival de la mosca (59) se requiere de GTP para la estimulación de la fosfolipasa C en respuesta a la 5-hidroxitriptamina. Tal efecto se ha producido también en membranas de hepatocitos de rata (60) y leucocitos humanos (61), lo que aumenta la posibilidad de que la proteína citada exista en la forma en que se ha postulado durante los últimos años. Otro signo confirmatorio de la existencia de la proteína G es que el tratamiento con la toxina pertussis bloquea el recambio de fosfoinosítidos en algunos tipos celulares (62).

La fosfolipasa C, que es el elemento central de todo el sistema, ha sido identificada (63) hasta el día de hoy en cuatro diferentes especies, la primera de las cuales tiene un peso de 56 kda (64) y las tres restantes de 85 (65), 138 (66,67) y 150 kda (68). Las cuatro enzimas actúan sobre el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato y lo hidrolizan a Inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y 1,2 diacilglicerol (DAG), moléculas que actúan posteriormente como los segundos mensajeros del sistema. La fosfolipasa, que ha probado ser una enzima de estructura compleja, se ha detectado tanto en la fracción soluble de la célula como embebida en las membranas plasmáticas. Durante algún tiempo se ha sabido que ciertas hormonas y nucleótidos de guanina poseen la capacidad de

estimular la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato en membranas, lo que sugiere que alguna fracción de la fosfolipasa C debe estar asociada a ellas. De cualquier forma ninguna de las enzimas ubicadas en tal sitio ha demostrado activarse en forma directa por nucleótidos de guanina ni se ha podido tampoco reconstituirlas con actividad funcional en bicapas con proteínas G purificadas. Algunos reportes sugieren también que la actividad de la enzima puede ser determinada en la fracción soluble de plaquetas (68,69) y timocitos (70) y que puede ser regulada por GTP y por nucleótidos de guanina. En algún momento se propuso que la actividad de la fosfolipasa ubicada en la fracción soluble se produce en el momento en que un agonista interacciona con su receptor induciendo la liberación de la subunidad alfa de  $G_p$  hacia el citoplasma, con lo que se promovería la activación a la que se aludió un poco antes. Sin embargo es preciso señalar que hasta la fecha no hay suficientes datos para apoyar con certeza la existencia de semejante reacción.

El sustrato de la fosfolipasa C, que según se dijo un poco antes es el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato ( $PIP_2$ ), se forma originalmente en la membrana plasmática a partir del fosfatidil inositol (PI) y del fosfatidil inositol 4 fosfato (PIP). Por su lado el  $PIP_2$  y el PIP pueden ser reconvertidos a PI por fosfatasas. Se han descrito en algunos tipos celulares una vía alterna para el metabolismo de fosfoinosítidos, en la que son hidrolizados por la fosfolipasa  $A_2$  para producir lisofosfolípidos y ácido araquidónico, mismo que es convertido

en ecosanoides, los cuales incluyen las prostaglandinas, conocidas por su acción vasodilatadora, los tromboxanos que inducen agregación plaquetaria y contracción del músculo liso y los leucotrienos, que pertenecen al tipo de sustancia llamadas de reacción lenta y que funcionan como reguladores de la respuesta inmune y como mediadores en ciertos procesos patológicos. (72-75)

El inositol trifosfato, que es uno de los segundos mensajeros del sistema examinado, actúa movilizándolo el calcio intracelular del retículo endoplasmático, donde se ha propuesto que existe un receptor específico diseñado para tal función (76-80). A su vez el aumento de los niveles de calcio se ve reducido, en el momento necesario, por las mitocondrias, que se encargan de capturarlo de la célula mediante la acción de una ATPasa localizada en la parte externa de la membrana mitocondrial. El calcio liberado por la acción del inositol trifosfato puede unirse eventualmente a proteínas o enzimas citoplasmáticas entre las que, de manera muy señalada, se encuentra la calmodulina. El complejo calcio-calmodulina tiene por su parte la función de intervenir en una serie de proteínas de las que depende la regulación de ciertas funciones metabólicas de la mayor importancia. El  $IP_3$  también puede efectuar otra serie de procesos fisiológicos como es el de modular la respuesta a canales sensibles a voltaje (81).

El inositol trifosfato es rápidamente metabolizado por conducto de dos vías alternas, la primera de las cuales lo convierte a inositol 1,3,4,5 tetrafosfato ( $IP_4$ ), lo que ocurre

mediante una fosforilación debida a la actividad de una cinasa. Este último metabolito parece tener un papel destacado en el ingreso del calcio a la célula, lo que tiene lugar para compensar los niveles de calcio que resultaron modificados por la actuación del  $IP_3$  (82,83). La segunda vía alterna se produce mediante la degradación del propio metabolito a través de una serie de fosfatasas que los convierten en inositol 1,4 bifosfato ( $IP_2$ ), Inositol 1 fosfato y mio-inositol, que estarán en libertad de integrarse a una nueva ruta metabólica. (73)

El otro segundo mensajero producido por la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato es el diacilglicerol, que es un compuesto hidrofóbico de aparición transitoria y cuya desaparición se produce en segundos o minutos de su formación. La velocidad con que ocurre esta degradación obedece a que es convertido a ácido fosfatídico o a 1-acilglicerol y ácido araquidónico, el que a su vez, puede originar otros mensajeros como las prostaglandinas. El diacilglicerol tiene además la función de activar a la proteína cinasa C, lo que se produce también de manera casi instantánea. Las consecuencias de la activación de esta enzima son de larga duración debido a que la actuación de la proteína cinasa C incorpora fosfatos de unión covalente modificando de esta manera la función de otras proteínas, lo que finalmente repercute de manera muy amplia en la duración de la respuesta. Se ha observado así mismo que la proteína cinasa C fosforila residuos de serina y treonina estableciendo con ellos un vínculo tan intenso que llega

incluso a conferirles resistencia ante la acción de las fosfatasa. (84)

Yasutomi Nishizuka demostró en 1977 que la proteína cinasa C a que se hizo mención en el párrafo anterior es una proteína, cuya fracción puede ser traslocada a la membrana mediante un sistema dependiente de calcio. La proteína cinasa C se extrae en altas concentraciones de quelantes de calcio para evitar proteólisis por proteasas dependientes de calcio, como la calpaína. Estudios recientes han demostrado que la proteína cinasa C requiere de calcio y fosfolípidos, particularmente de la fosfaditilserina, que interviene en forma decisiva en su activación. También se puede activar a la mencionada cinasa mediante la proteólisis limitada con calpaína, fenómeno donde la proteína se muestra más sensible cuando está asociada a la membrana. (85,86)

Hasta el momento se han caracterizado de manera completa siete formas de la cinasa C , denominadas  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $r$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  (74). Todas estas variantes de la forma original presentan una región hidrofóbica, o regulatoria , y otra hidrofílica o catalítica. La primera de estas regiones es la responsable de efectuar la unión con el calcio, diacilglicerol y fosfolípido. La segunda región, que se encarga de efectuar la reacción química correspondiente, tiene un dominio catalítico de 592 a 737 residuos de aminoácidos que le dan un peso molecular de de 63 a 87 Kda. Es importante mencionar que la forma  $\alpha$  se presenta de forma universal. La ubicación de este dominio catalítico esencial no ha sido determinado hasta la fecha, aunque se



conjetura que se halla emplazado en torno al extremo carboxilo, lo que dejaría el extremo regulatorio situado alrededor del extremo amino.

La versatilidad bioquímica y la importancia metabólica de la proteína cinasa C ha determinado un aumento constante en el número de investigadores y laboratorios dedicados al área de transducción de señales. La necesidad, además, de manipular a la enzima desde todos los ángulos posibles para obtener un máximo de información ha promovido el desarrollo de una serie de análogos farmacológicos destinados a activarla en ausencia del estímulo hormonal. Entre los análogos mencionados se encuentran de manera muy especial el 1-Oleoil-2-acilglicerol, el 1-2 dioctano glicerol y el 1-2 didecanoil glicerol(87). Los compuestos enumerados tienen la facultad, providencial para los investigadores, de intercalarse en la membrana celular provocando, de esta manera, la activación de la cinasa con la misma intensidad y efectos que en el caso del mecanismo original. Además, pueden ser degradados a ácido fosfatídico, que es la vía natural por la cual se metaboliza normalmente el diacilglicerol.(88,89)

Los ésteres de forbol, que pueden promover tumores, como el 12-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), cuya configuración exhibe una gran similitud al diacilglicerol, pueden activar también a la cinasa c tanto in vivo como in vitro. El TPA se comporta fisiológicamente como el diacilglicerol debido a que aumenta de manera importante la afinidad de la enzima por los iones calcio, lo que permite activarla sin necesidad de

promover, además, un incremento simultáneo de las concentraciones de calcio (90,91). Durante los últimos años se ha podido demostrar que la activación de la cinasa C por ésteres de forbol tiene la facultad de inducir una gran variedad de respuestas celulares. Entre ellas es necesario subrayar las que tienen la capacidad de promover la expresión de ciertos genes, como el de la ornitina descarboxilasa (92), la histidina-descarboxilasa (93), la serotonina-acetiltransferasa (94), calcitonina (95) y prolactina (96). Se ha demostrado que también son blanco de la cinasa C algunos protooncogenes como c-fos (97) y c-myc (98), lo cual es de suma importancia porque su expresión se halla asociada, a su vez, a la expresión de factores de crecimiento y por lo tanto a la proliferación celular.

Es preciso hacer notar que la proteína cinasa C no sólo tiene la facultad de fosforilar sustratos citosólicos sino que en determinadas condiciones puede hacer lo mismo con ciertos sustratos que se hallan situados sobre la membrana plasmática. Ejemplos de lo anterior son los canales, bombas e intercambiadores iónicos que al verse afectados por la fosforilación auspiciada por la enzima sufren determinados cambios en sus rangos de conductancia y pH (99). Otro sustrato membranaral de la propia enzima son los receptores de insulina, factor de crecimiento y  $\alpha_1$ -adrenérgico. Uno de los efectos más espectaculares de la cinasa al actuar sobre los receptores es la fosforilación de otros receptores, que a su vez, se hallan acoplados a su propio sistema de activación, fenómeno que se

presenta en muy variados tipos celulares, como hepatocitos (100-102) , músculo liso (103) , plaquetas (104) y células de astrocitoma (105), lo que evidencia el funcionamiento paralelo de un sistema de retroalimentación negativa. La versatilidad inmensa de la célula le permite, en la región de los receptores, responder de manera indistinta tanto al sistema de la adenilato ciclasa como al de fosfoinosítido calcio, que no sólo reaccionan ante el estímulo hormonal propio sino que tienen la facultad de reaccionar entre sí formando una enramada de regulación recíproca.

La evidencia experimental que permitió establecer el mecanismo descrito en el párrafo anterior se obtuvo al observar que la activación de la proteína cinasa C potencia la producción de AMPc en células de la glándula pineal (106), eritrocitos de pavo (107) y linfoma (108). Aunque no se conoce con certeza la índole real del fenómeno se ha propuesto la posibilidad de que la proteína cinasa C facilite la acción de Gs sobre la adenilato ciclasa. Así mismo la activación de la proteína cinasa C en células de Leydig inhibe y desensibiliza al sistema de la adenilato ciclasa (109), en hepatocitos de rata el TPA reduce la acumulación del AMPc (110,111), afectando además la respuesta metabólica (112). Se encontró además en experimento in vitro que la adenilato ciclasa es sustrato de la proteína cinasa C (115). Se ha sugerido que la activación de la cinasa puede utilizar también como sustrato a la subunidad alfa de proteínas G. Estudios in vitro, por ejemplo, han mostrado que la proteína cinasa C es capaz de

fosforilar a  $\alpha$  Gi (113) y a  $\alpha$ Gt (114), ésta última acoplada al sistema de la transducina. Sin embargo la misma proteína en su versión heterotrimérica es un mal sustrato de la cinasa C. Todo lo cual viene a confirmar una vez más que la proteína de que se ha venido hablando puede ampliar su efecto sobre otros sistemas de transducción.

El sistema de la adenilato ciclasa, a su vez, es capaz de modular la respuesta de otro sistema. En plaquetas se encontró que incrementos en el AMPc bloquean la respuesta a fosfoinositicos-calcio estimulada por trombina (116,117). Por otra parte se ha propuesto que el AMPc bloquea la formación de fosfoinosítidos (118), lo que también confirma la idea de que ambos sistemas se hallan en estrecha comunicación.

A lo largo de las últimas líneas hemos venido examinando los aspectos fundamentales de los dos sistemas de transducción más ampliamente estudiados, que son el de la adenilato ciclasa y el de fosfoinosítidos calcio. A continuación se pasará a exponer en sus fases más generales el efecto de la epinefrina sobre ambos sistemas, en especial el que ejerce sobre el brazo inhibitorio del sistema de la adenilato ciclasa, que es, en último termino, el objeto esencial de esta investigación.

Antes de proceder a exponer los móviles y estrategias del presente trabajo, será necesario decir que la epinefrina es una hormona que pertenece al grupo de las catecolaminas, cuya síntesis se origina en las células cromafinas de la médula de las glándulas suprarrenales y de los nervios simpáticos y cuyo precursor es la tirosina, un aminoácido básico de naturaleza

polar.(119). La epinefrina tiene la facultad de activar de manera indistinta tanto al sistema de la adenilato como al de fosfoinosítidos, pues ambos disponen de receptores adrenérgicos susceptibles de asociarse a la hormona. Los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  están acoplados en forma estimulatoria al sistema de la adenilato, los receptores  $\alpha_1$  al recambio de fosfoinosítidos y finalmente los  $\alpha_2$  adrenérgicos se hallan acoplados de manera inhibitoria a a la adenilato ciclasa. La caracterización de los diversos receptores  $\beta$  adrenérgicos se hizo con el auxilio de criterios farmacológicos y fue, en cierta medida, más sencilla que la de su contraparte, los receptores  $\alpha$  adrenérgicos, que requirió una serie de experimentos mucho más detallados y laboriosos. En 1965 Earl Sutherland (120), uno de los pioneros más eminentes en el campo, sugirió la posibilidad de que el receptor  $\alpha$  no tuviera ninguna relación con la adenilato ciclasa, pero señaló así mismo la necesidad de explorar en forma exhaustiva la existencia, en ese momento hipotética, de un sistema paralelo de inhibición. Ese mismo año, utilizando una serie de agonistas y antagonistas, Rossum (121) observó ciertas diferencias en la respuesta  $\alpha$  adrenérgica al utilizar células de vas deferens y de intestino de conejo. El siguiente paso importante en esta dirección lo dio Robinson en 1967, (122) lo que hizo utilizando islotes pancreáticos y adipocitos de rata previamente incubados en epinefrina y propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico). El resultado de estas indagaciones evidenció un descenso de los niveles de AMPc por debajo de los controles. Todo lo anterior le permitió deducir

que los receptores alfa adrenérgicos inhibían a la adenilato ciclasa mientras que los  $\beta$ -adrenérgicos la estimulaban.

La caracterización de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos recibió un nuevo y significativo impulso en 1973, cuando Del Barre y Schmit (123) sugirieron algunos subtipos de propios receptores, que funcionarían como contrapartes de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Finalmente, en 1980, con los trabajos de John Fain y J. Adolfo García Sainz (124-127), se sugirió la hipótesis de que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos participaban en la mediación de ciertos efectos importantes, como el aumento del calcio intracelular y un incremento en el recambio de fosfoinosítidos. Se propuso también, en el curso de la misma investigación, que los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos se encontraban acoplados de manera inhibitoria al sistema de la adenilato ciclasa, lo que no sólo permitió obtener una identificación farmacológica de los receptores mencionados en último termino sino que presentó evidencias bioquímicas de que ambas respuestas eran diferentes.

En el curso de las investigaciones reseñadas en los últimos párrafos se utilizaron diversos tipos celulares cuya naturaleza los convirtió en un campo adecuado de observación experimental. Sin embargo las membranas de plaquetas han probado ser de una enorme utilidad para esclarecer el funcionamiento de la respuesta  $\alpha_2$  adrenérgica acoplada de manera inhibitoria al sistema de la adenilato ciclasa. La razón de esta ventaja significativa radica en que los receptores  $\alpha$  de las plaquetas son, exclusivamente,  $\alpha_2$ -adrenérgicos (128). Así

mismo el efecto de inhibición de la adenilato ciclasa ha sido ampliamente caracterizado no sólo en condiciones basales sino en el evento de que los receptores hayan sido estimulados con otro agente, vgr la prostaglandinas, y posteriormente inhibidos con la adición de epinefrina, lo que promovería a su vez la disminución de los niveles de AMPc (129,130). Posteriormente, y al estarse examinando los fenómenos inhibitorios descritos se determinó la necesidad de que el sistema dispusiera de un reservorio de GTP para funcionar con máxima eficacia. Al observar el mecanismo del efecto inhibitorio se encontró que las concentraciones de GTP requeridas, tanto en condiciones basales como en aquellas estimuladas por prostaglandinas  $E_1$ (PGE<sub>1</sub>) son de 0.3 y 10 micromolar para detectar la mitad de la máxima (IC<sub>50</sub>) y la máxima inhibición por epinefrina. Sin embargo el brazo estimulatorio del sistema de la adenilato ciclasa activado por PGE<sub>1</sub> requiere menos concentración de GTP para la estimulación de la enzima (131).

Otro hallazgo importante de los efectos del GTP en la inhibición inducida por epinefrina fue la estimulación de la GTPasa en membranas de plaquetas, lo que promueve a su vez la hidrólisis del propio nucleótido. Por otro lado es necesario decir que la inhibición de la adenilato ciclasa y la estimulación de la GTPasa ocurren a las mismas concentraciones de epinefrina, lo que apoya la idea de la interacción del receptor con una proteína G. En 1980 Brian Hoffman y colaboradores (132) encontraron que los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en membranas de plaquetas presentan un estado de

alta afinidad y otro de baja afinidad cuando se hallan desprovistos de nucleótidos de guanina. Sin embargo se observó también que la adición de nucleótidos de guanina al medio inducía a los receptores  $\alpha_2$  a adoptar sólomente un estado de baja afinidad. Estos hallazgos sugirieron la presencia de una proteína fijadora de nucleótidos de guanina acoplada de manera inhibitoria al sistema de la adenilato ciclasa (Gi).

Otra aportación de gran valor para la caracterización de las proteínas Gi fueron los experimentos realizados con la toxina Pertussis. En 1979, en el laboratorio de Katada y Ui (133), se encontró que al adicionar la toxina al medio de cultivo de células de islotes pancreáticos de rata se bloqueaban los efectos inhibitorios del sistema de la adenilato ciclasa. Sin embargo los datos anteriores fueron interpretados de manera insuficiente por los autores citados y no fue sino en 1981 cuando J. Adolfo García-Sainz (134) encontró que al adicionar toxina pertussis a hamsters se registró una notable disminución en la respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica en adipocitos, lo que no fue exclusivo de los receptores antes mencionados, sino también con otros agentes acoplados de manera inhibitoria a la ciclasa como adenosina y prostaglandina. En vista de los resultados expuestos García-Sainz sugirió la posibilidad de que el blanco de acción de la toxina fuera la proteína Gi. Posteriormente al activar el brazo estimulador de la adenilato ciclasa con glucagon las mismas células presentaban incrementos en la acumulación de



AMPC, lo que demostró que la toxina ADP-ribosilaba a la proteína Gi bloqueando de esta manera sus efectos inhibitorios sobre la enzima (135).

Poco después, Klaus Aktories (136) encontró que la toxina pertussis tenía el poder de inhibir los efectos de la epinefrina en la activación de la GTPasa. La revelación anterior se complementó en 1984 cuando Murayama y Ui (137) obtuvieron datos que indicaban que las membranas de adipocitos de Hamster tratadas con la misma toxina pertussis, antes y después de la estimulación con epinefrina, producían una notable disminución en la liberación de GDP, lo que sugirió la idea de que la ADPribosilación con toxina pertussis desacoplaba a los receptores inhibitorios. En ese mismo año J. Adolfo García Sainz y colaboradores (138), utilizando membranas de adipocitos, encontraron que el tratamiento con la toxina reducía notablemente el número de receptores en alta afinidad sin, al mismo tiempo, disminuir el número de receptores totales y siempre y cuando la observación se efectuara en ausencia de nucleótidos de guanina. Los experimentos anteriores sugirieron de manera conclusiva que la modificación covalente de la toxina pertussis alteraba la interacción de Gi con los receptores, lo que tenía el efecto concomitante de prevenir la activación de Gi mediada por receptor.

En líneas anteriores se hizo referencia a los efectos de la epinefrina y a su habilidad de activar los dos sistemas de transducción de señales a través de sus diferentes receptores. Como se dijo entonces se sabe también que los

sistemas de transducción pueden reaccionar entre sí y de esta manera integrar los mecanismos de activación celular mediante una gran variedad de señales extracelulares. Jacobs y sus colaboradores encontraron en fecha reciente que la activación de la proteína cinasa C con ésteres de forbol interfiere en la inhibición de la adenilato ciclasa, ya sea que la reacción proceda por medio de GTP o bien con epinefrina y GTP. Los mismos investigadores descubrieron además que en las membranas de plaquetas tratadas con TPA la activación hormonal del brazo inhibitorio de la adenilato ciclasa con PGE1 no se ve afectada en el curso de la reacción (139,140). Los datos anteriores sugerían que el tratamiento con TPA en plaquetas intactas no presentaba efectos en ninguno de los componentes del brazo estimulador de la adenilato ciclasa, que según se dijo antes se compone de receptor estimulador, proteína Gs y subunidad catalítica. Sin embargo no dejó de verse que la activación de la proteína cinasa c con TPA alteraba la respuesta inhibitoria del sistema de la adenilato ciclasa, lo que podría obedecer, tal vez, al hecho de que el blanco real de la enzima fuera la proteína Gi, cuya acción sería la responsable de bloquear el efecto inhibitorio señalado. Los mismos autores advirtieron que a concentraciones 1 micromolar de TPA durante un minuto a 37 grados centígrados se obtenía un máximo de bloqueo de la respuesta inhibitoria. Resultados similares se obtuvieron al adicionar la proteína cinasa C parcialmente purificada en membranas de plaqueta, lo que vino a confirmar que los efectos

del TPA sobre el brazo inhibitorio de la adenilato ciclasa se debían a la acción de la misma enzima.

Katada, que en 1985 (141) se dedicó a estudiar el blanco de acción de la proteína cinasa C sobre el sistema inhibitorio de la adenilato ciclasa, encontró que en membranas de plaqueta una proteína de 41 Kda, entre otras, se fosforilaba por la acción de la cinasa c, lo que a su juicio sugería la posibilidad de que la subunidad  $\alpha$  de Gi fuera el sustrato de la enzima en cuestión. En todo caso no se ha demostrado aún que la reacción descrita opere de la misma forma en experimentos in vivo. Cuando, por ejemplo, se utilizaron hepatocitos de rata no estimulados e incubados en presencia de fósforo <sup>32</sup> se logró inmunoprecipitar con anticuerpos dirigidos contra  $\alpha$ Gi a una fosfoproteína de 41 Kda. Además si estas mismas células se incuban en presencia de TPA se observará un incremento del 70 por ciento de fosforilación en dicha proteína (142), todo lo cual sugerirá la fosforilación de Gi citada un poco más arriba. Con el mismo objetivo en mente otros grupos de investigadores inmunoprecipitaron una proteína fosforilada con las características inmunológicas de  $\alpha$ Gi y detectaron, por su parte, un incremento en la fosforilación al utilizar TPA (143). De cualquier manera no ha sido posible establecer con absoluta claridad la fosforilación de  $\alpha$ Gi, ya que otros grupos indicaron que la proteína fosforilada es la subunidad  $\alpha$  de Gz. (144)

Como se ha visto a lo largo de estas notas introductorias la proteína cinasa c es capaz de ejercer una regulación negativa en su propio sistema de transducción de señales. Tiene

así mismo la facultad de modular al sistema de la adenilato ciclasa bloqueando la inhibición de la respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica en plaquetas. Todo lo anterior parece indicar que un sustrato de la cinasa C es la proteína fijadora de nucleótidos de guanina acoplada de manera inhibitoria al sistema de la adenilato ciclasa. Los fenómenos que se han venido reseñando han sido objeto de un estudio intenso durante los últimos años y aunque todavía no se han esclarecido en su totalidad representan ya un campo altamente articulado de la bioquímica moderna, razón por la cuál el presente estudio se dirigirá a estudiar los efectos de los ésteres de forbol en la respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica, ángulo de la investigación que a nuestro juicio se halla también lleno de posibilidades.

## OBJETIVOS

Utilizando como modelo experimental plaquetas obtenidas de sangre de donadores se procedió a estudiar la modulación de la respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica por el 12-tetradecanoil-13-acetato (TPA) y a evaluar la funcionalidad de las proteínas Gi como moduladoras del estado de afinidad de los receptores y como efectoras en la respuesta inhibitoria de la adenilato ciclasa.

## METODOLOGIA

La metodología utilizada en la ejecución de los presentes experimentos se halla consignada en los artículos que se prepararon como parte integral de esta tesis y aparecen incluidos a continuación. Se mencionarán también dos metodologías que no fueron usadas en aquella oportunidad y que por tal motivo se harán constar en los renglones que siguen.

Cantidades iguales de membranas de plaquetas control y membranas de plaquetas tratadas con TPA fueron sometidas al método de Lowry (145) para cuantificación de proteínas y posteriormente a una corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes, según Laemmli (146), hecho lo cual se procedió a realizar un Inmunoblott sobre las mismas muestras de acuerdo a los métodos convencionales (146). El primer anticuerpo empleado en la metodología citada en último lugar se dirigió contra el decapeptido del carboxilo terminal de  $\alpha$ -G<sub>i2</sub>. El segundo anticuerpo empleado, que se utilizó para conducir la reacción inicial hasta sus cosecuencias finales, se hallaba acoplado a una fosfatasa alcalina.

Con la finalidad de averiguar si el TPA fosforilaba  $\alpha$ Gi se realizaron estudios de fosforilación e inmunoprecipitación, para lo que se obtuvieron las plaquetas de 50 ml de sangre humana y se procedió a realizar la fosforilación conforme al método de Lapetina (143).

La inmunoprecipitación de las proteínas fosforiladas de plaquetas se realizó también según el método del autor mencionado en la referencia anterior. Una vez inmunoprecipitadas las proteínas se sometieron a una electroforesis desnaturizante, se secó el gel y se practicó una autorradiografía.

## RESULTADOS

Los resultados expuestos en la presente sección fueron dados a conocer en 1989 y 1991 en :

J. Adolfo García-Sainz and Gloria Gutiérrez-Venegas (1989).  
Activation of protein kinase C alters the interaction of alpha2-adrenoceptors and the inhibitory GTP-binding protein in human platelets. FEBS Lett. 257:427-430.

Gloria Gutiérrez-Venegas and J. Adolfo García-Sainz (1991).  
Activation of protein kinase C inhibits hormonal stimulation of the GTPase activity of Gi in human platelets. FEBS Lett. EN PRENSA.



# Activation of protein kinase C alters the interaction of $\alpha_2$ -adrenoceptors and the inhibitory GTP-binding protein ( $G_i$ ) in human platelets

J. Adolfo García-Sáinz and Gloria Gutiérrez-Venegas

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-248, México DF 04510, México*

Received 18 September 1989

The effect of 12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) on the hormonal modulation of adenylate cyclase was studied. The effect of epinephrine ( $\alpha_2$ -adrenergic action) was markedly diminished in membranes from TPA-treated platelets as compared to the controls. Interestingly, the inhibitory effect of guanylyl imido diphosphate (Gpp(NH)p) was not altered. Neither the number of  $\alpha_2$ -adrenoceptors nor their affinity for [ $^3$ H]yohimbine were affected by the treatment with TPA. In control platelets, 77% of the receptors were in a high-affinity state for epinephrine and 22% in a low-affinity state. Gpp(NH)p shifted the receptor affinity towards the low-affinity conformation. In membranes from TPA-treated platelets, the receptors were in the low-affinity state and no further decrease in affinity was induced by Gpp(NH)p. Our data suggest that activation of protein kinase C in platelets blocks the hormonal inhibition of adenylate cyclase by interfering with the receptor-G<sub>i</sub> interaction.

Protein kinase C; Enzyme activation; Receptor-protein interaction; Adrenoceptor

## 1. INTRODUCTION

Protein kinase C participates in the intracellular propagation of signals that act through the calcium-phosphoinositide transduction system [1]. However, its importance goes much beyond this, protein kinase C provides positive forward as well as negative feedback controls over various steps of its own and other signalling pathways [2].

The adenylate cyclase complex (receptors, G-proteins and the catalytic subunit) seems to be a target of protein kinase C and thus, one of the sites through which major interaction between these two signalling pathways takes place [2]. It has been observed that activation of protein kinase C modulates the activation of adenylate cyclase induced by hormones and neurotransmitters [3-5] and impairment of the hormone-sensitive inhibitory pathway of adenylate cyclase by protein kinase C has been reported [6-9].

Treatment of human platelets with 12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) largely impairs the GTP-dependent hormone-sensitive inhibitory pathway to adenylate cyclase which involves the inhibitory GTP-binding protein,  $G_i$  [6-9]. Protein kinase C phosphorylates  $G_i$  [7] and suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase [6-9].

Guanine nucleotide-binding proteins seem to exert two basic functions: first, to regulate the activity of membrane effectors (i.e. to activate or inhibit enzymes,

such as adenylate cyclase phospholipase A<sub>2</sub> or phospholipase C and ionic channels) [10,11] and second, to modulate the affinity state of hormone receptors [12].

Using human platelets we examined the effect of TPA on these two functions of  $G_i$ ; our results suggest that activation of protein kinase C uncouples  $G_i$  from the  $\alpha_2$ -adrenoceptors without altering the interaction of  $G_i$  with adenylate cyclase.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Blood was obtained from healthy men and women who had taken no medication during the previous 2 weeks. Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation. In some experiments the platelet-rich plasma was incubated with 1 mM aspirin for 30 min at 37°C to inhibit cyclooxygenase [13]; this treatment did not alter the results obtained. After a preequilibration period of 5 min at 37°C, the platelets were challenged with 1  $\mu$ M TPA, or vehicle for 1 min; the platelets were centrifuged and homogenized. A crude membrane preparation was obtained as described by Hoffman et al. [14].

Adenylate cyclase activity was assayed in a mixture containing 25 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ATP (containing [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP 500000 cpm per tube), 5 mM theophylline, 2.5 mg/ml phosphocreatine and 1 mg/ml creatine kinase; the reaction was started by the addition of membrane protein (50  $\mu$ g) and it was carried out for 20 min at 30°C in a total volume of 0.1 ml. Cyclic AMP was isolated by the method of Salomon et al. [15].

[<sup>3</sup>H]Yohimbine binding studies were performed as described by Hoffman et al. [14]. The binding competition experiments were analyzed by computer modelling techniques [15-17].

## 3. RESULTS

Basal adenylate cyclase activity was similar in membranes from control and TPA-treated platelets (26 = 6

Correspondence address: J.A. García-Sáinz, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-248, México DF 04510 México

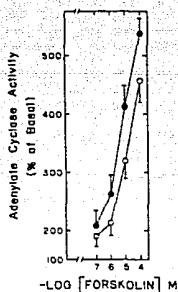


Fig. 1. Effect of TPA on the stimulation of adenylate cyclase activity by forskolin. Membranes from control (open circles) or TPA-treated (closed circles) platelets were incubated with different concentrations of forskolin. Results are expressed as % of basal activity. Plotted are the means and vertical lines represent the SE of 6 experiments in triplicate using different membrane preparations.

and  $25 \pm 5$  pmol/min per mg protein for membranes for control and TPA-treated platelets, respectively (means  $\pm$  SE,  $n = 10$ ). Forskolin stimulated adenylate cyclase activity in a dose-dependent fashion in membranes from control and TPA-treated platelets (fig. 1). However, the activation induced by the diterpene was slightly greater in membranes from TPA-treated platelets than in the controls (fig. 1). Epinephrine induced a dose-dependent inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity (fig. 2); the effect of epinephrine was blocked by  $10 \mu\text{M}$  yohimbine indicating the involvement of  $\alpha_2$ -adrenoceptors (not shown). In agreement with the data of Jakobs et al. [6], we observed that the effect of epinephrine was marked-

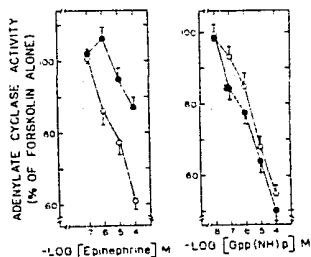


Fig. 2. Effects of epinephrine or Gpp(NH)p on forskolin-stimulated adenylate cyclase activity. Membranes from control (open circles) or TPA-treated (closed circles) platelets were incubated with  $100 \mu\text{M}$  forskolin and either  $10 \mu\text{M}$  GTP and different concentrations of epinephrine (left panel) or different concentrations of Gpp(NH)p (right panel). Results are expressed as % of the adenylate cyclase activity observed in the presence of forskolin alone. Plotted are the means and vertical lines represent the SE of 10 experiments in triplicate using different membrane preparations.

Table 1  
Effect of TPA on [ $^3\text{H}$ ]yohimbine binding

Treatment	$B_{\text{max}}$ (fmol/mg per protein)	$K_d$ (nM)
Control	$118 \pm 10$	$3.2 \pm 0.3$
TPA	$140 \pm 19$	$3.5 \pm 0.3$

Membranes from control or TPA-treated platelets were incubated with [ $^3\text{H}$ ]yohimbine as described in section 2. Results are the means  $\pm$  SE from 3 separate experiments in triplicate

ly reduced in membranes from TPA-treated platelets as compared to the controls, i.e.  $100 \mu\text{M}$  epinephrine induced a 35–40% inhibition of adenylate cyclase activity in control membranes whereas in membranes from TPA-treated platelets the same concentration of epinephrine induced only a 5–10% inhibition (fig. 2). The effect of the treatment with TPA was not exclusive for epinephrine. The action of other agents that inhibit adenylate cyclase through their own receptors such as thrombin and platelet activating factor (PAF) was also similarly diminished (data not shown). Interestingly, the inhibitory action of the hydrolysis resistant analogue of GTP, Gpp(NH)p, was identical in membranes from control and TPA-treated platelets (fig. 2).

We next examined the effect of TPA treatment on the  $\alpha_2$ -adrenoceptor number and affinity using [ $^3\text{H}$ ]yohimbine. Scatchard plots of the binding data were linear, consistent with a single type of receptor; no significant difference in  $B_{\text{max}}$  or  $K_d$  was observed between control membranes and those from TPA-treated platelets (table 1). The data indicate that neither the number of sites nor their affinity for the antagonist is altered by the treatment with TPA.

In membranes from control platelets, the displacement of [ $^3\text{H}$ ]yohimbine binding by epinephrine was dose-dependent (fig. 3) and gave a shallow curve with a

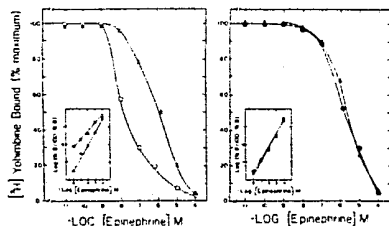


Fig. 3. Displacement by epinephrine of specific [ $^3\text{H}$ ]yohimbine binding. Membranes from control (open symbols) or TPA-treated platelets (solid symbols) were incubated with  $7 \text{ nM}$  [ $^3\text{H}$ ]yohimbine and different concentrations of L-epinephrine in the absence (circles) or presence (triangles) of  $100 \mu\text{M}$  Gpp(NH)p. Plotted is a representative experiment of 6 replicates, with different membrane preparations. The insets show the Hill analysis of the competition studies.

Table 2

Parameters derived from the computer modelling of competition curves of epinephrine with [<sup>3</sup>H]yohimbine

Treatment	Agents	[ <sup>3</sup> H]Yohimbine				
		K <sub>1</sub> (nM)	%	K <sub>2</sub> (nM)	%	Hill coefficient
Control	epinephrine <sup>a</sup>	20 ± 20	77 ± 5	3000 ± 700	22 ± 6	0.45 ± 0.03
	epinephrine + Gpp(NH)p	-	-	2000 ± 100	100	0.72 ± 0.02 <sup>b</sup>
TPA	epinephrine	-	-	1700 ± 100	100	0.74 ± 0.04
	epinephrine + Gpp(NH)p	-	-	1800 ± 200	100	0.72 ± 0.04

<sup>a</sup> Two-state fit significantly better than one-state fit (*P* < 0.05)<sup>b</sup> *P* < 0.001 as compared to epinephrine alone, control

Results are the means ± SE of 6 experiments in triplicate using different membrane preparations

Hill coefficient of 0.45, which suggests the presence of heterogeneous binding sites. Addition of 0.1 mM Gpp(NH)p induced an approximately 30-fold shift to the right in the displacement curve and an increase in the Hill slope to 0.72 (fig.3). This Hill slope suggests that some heterogeneity may still persist in the binding sites; similar results have been observed by other authors [18] but the reason is unknown. Computer modelling of the data indicated in the absence of Gpp(NH)p the presence of two classes of binding sites with high (*K*<sub>1</sub>) and low (*K*<sub>2</sub>) affinities for epinephrine (table 2); most of the receptors were in the high-affinity state for agonists. The competition curve in the presence of Gpp(NH)p gave a binding isotherm consistent with a single class of binding sites whose affinity for epinephrine was similar to the *K*<sub>2</sub> observed in the absence of Gpp(NH)p (table 2).

The displacement of [<sup>3</sup>H]yohimbine binding by epinephrine in membranes from TPA-treated platelets showed two important differences with the controls (fig.3): first, the displacement curve in the absence of Gpp(NH)p was steeper (Hill, 0.74) and shifted to the right; second, no further effect of Gpp(NH)p was observed (fig.3). Computer modelling indicated that in these membranes a single type of sites was detected regardless of the presence or absence of Gpp(NH)p (table 2).

#### 4. DISCUSSION

Our present data confirm and extend those of Jakobs and co-workers [6-9] and indicate that activation of protein kinase C leads to an impairment of the hormone-sensitive inhibitory branch of adenylate cyclase. The alteration of the inhibitory branch of adenylate cyclase was observed for three agents (epinephrine, PAF, thrombin) acting through independent receptors. These data are consistent with the idea that the coupling between these receptors and the catalytic subunit of adenylate cyclase is affected by protein kinase C: such coupling is mediated via the in-

hibitory guanine nucleotide-binding regulatory protein, G<sub>i</sub>.

Interestingly, the inhibitory effect of Gpp(NH)p on forskolin-stimulated adenylate cyclase activity was not altered in membranes from TPA-treated platelets, which suggest that the mechanism(s) through which G<sub>i</sub> inhibits adenylate cyclase are not altered by protein kinase C. In other words, the data suggest that the alteration induced by protein kinase C on G<sub>i</sub> does not affect its interaction with the catalytic subunit of adenylate cyclase but rather that it is the receptor-G<sub>i</sub> interaction that is affected. Direct evidence for an altered receptor-G<sub>i</sub> interaction was obtained in the binding studies. However, the possibility of an additional defect in the G<sub>i</sub>-adenylate cyclase interaction cannot be completely ruled out. Two reasons exist for such reserve: (i) firstly, our understanding of the mechanism(s) through which adenylate cyclase is inhibited by G<sub>i</sub> is incomplete [19-21] and (ii) secondly, it is not known if the mechanisms of activation of G<sub>i</sub> by hydrolysis resistant analogues of GTP are identical to those of the natural nucleotide. Regarding this latter point, GTP has a biphasic effect on human platelet adenylate cyclase, increasing enzyme activity at sub-micromolar concentrations and inducing inhibition at higher concentrations [8]; TPA blocks the inhibitory phase of GTP action [8]. However, hydrolysis-resistant analogues of GTP, such as GTP[S] or Gpp(NH)p (this manuscript), inhibit adenylate cyclase similarly in membranes from control and TPA-treated platelets.

There is evidence that many receptors including α<sub>2</sub>-adrenoceptors exist in two interconvertible affinity states for agonists (high- and low-affinity states). The conversion of the low-affinity state to the high-affinity state seems to involve the interaction with G-proteins; reconstitution of the high-affinity state for agonists of platelet α<sub>2</sub>-adrenoceptors with exogenous G<sub>i</sub> has already been reported [22]. Our binding data indicate that in membranes from TPA-treated platelets, α<sub>2</sub>-adrenoceptors remain in the low-affinity state for agonists which suggests that the receptor-G<sub>i</sub> interaction

is perturbed by pretreatment with TPA and that therefore the  $\alpha_2$ -adrenoceptors are unable to form the high-affinity state for agonists. Remarkable similarities exist between the effects of TPA on platelets reported here and those of pertussis toxin on other cells.

*Acknowledgements:* The authors thank Ms Guadalupe Ramirez for typing the manuscript. The authors also thank the blood donors and Miss Lucia Yáñez for obtaining the blood samples. This research was supported in part by grants from CONACyT (ICEXCNA 060394), The Third World Academy of Sciences (TWAS RGBC 88-93) and Fundación Miguel Alemán.

## REFERENCES

- [1] Nishizuka, Y. (1984) *Science* 225, 1365-1370.
- [2] Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233, 305-312.
- [3] Sugden, D., Vanecek, J., Klein, D.C., Thomas, T.P. and Anderson, W.B. (1985) *Nature* 314, 359-361.
- [4] Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1987) *Nature* 327, 67-70.
- [5] García-Sáinz, J.A., Mendlovic, F. and Martínez-Olmedo, M.A. (1985) *Biochem. J.* 228, 277-280.
- [6] Jakobs, K.H., Bauer, S. and Watanabe, Y. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 425-430.
- [7] Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S. and Jakobs, K.H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 431-437.
- [8] Watanabe, Y., Horn, F., Bauer, S. and Jakobs, K.H. (1985) *FEBS Lett.* 192, 23-27.
- [9] Bauer, S. and Jakobs, K.H. (1986) *FEBS Lett.* 198, 43-46.
- [10] Gilman, A.G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
- [11] Iyengar, R. and Birnbaumer, L. (1987) *ISI Atlas of Science I*, 213-221.
- [12] Ross, E.M., Magure, M.E., Sturgill, T.W., Biltonen, R.L. and Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5761-5775.
- [13] Burch, J.W., Stanford, N. and Majerus, P.W. (1978) *J. Clin. Invest.* 61, 314-319.
- [14] Hoffman, B.B., Michel, T., Breeneman, T.B. and Lefkowitz, R.J. (1982) *Endocrinology* 110, 926-932.
- [15] Salomon, Y., Londos, C. and Roubell, M. (1974) *Anal. Biochem.* 58, 541-548.
- [16] DeLean, A., Munson, P.J. and Lefkowitz, R.J. (1978) *Am. J. Physiol.* 235, E97-E102.
- [17] Hoffman, B.B., Mullikin-Kilpatrick, D. and Lefkowitz, R.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4645-4652.
- [18] Neubig, R.R., Gantzos, R.D. and Thomsen, W.J. (1988) *Biochemistry* 27, 2374-2384.
- [19] Katada, T., Bokoch, G.M., Smigel, M.D., Ui, M. and Gilman, A.G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3586-3595.
- [20] Hildebrandt, J.D., Codina, J. and Birnbaumer, L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 13178-13185.
- [21] Toro, J.M., Montoya, E. and Birnbaumer, L. (1987) *Mol. Endocrinol.* 1, 669-676.
- [22] Kim, M.H. and Neubig, R.R. (1987) *Biochemistry* 26, 3664-3672.

"ACTIVATION OF PROTEIN KINASE C INHIBITS HORMONAL STIMULATION  
OF THE GTPase ACTIVITY OF Gi IN HUMAN PLATELETS"

Gloria Gutiérrez-Venegas  
and J. Adolfo García-Sáinz

Instituto de Fisiología Celular, UNAM; Ap. Postal 70-248; 04510  
México D.F. México.

Correspondence address: J. A. García-Sáinz, Instituto de  
Fisiología Celular, UNAM. Ap. Postal 70-248; 04510 México, D.F.  
México.

Key words: Protein Kinase C, Enzyme activation

Gi, GTPase activity

Alpha<sub>2</sub>-Adrenoceptors

## Summary

The effect of 12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate on the GTPase activity of Gi was investigated. It was observed that treatment with TPA did not alter the basal GTPase activity of the membranes or the stimulatory effect of prostaglandin E<sub>1</sub> (putatively via G<sub>s</sub>). In contrast the active phorbol ester markedly diminished the stimulation of GTPase induced by agents whose receptors are coupled to Gi such as epinephrine (alpha<sub>2</sub>-adrenergic action), platelet activating factor or thrombin. Pertussis toxin catalyzed ADP-ribosylation was also decreased in membranes from TPA-treated platelets as compared to the controls. It is suggested that the alteration in the hormonal activation of the GTPase activity of Gi is secondary to a perturbation in the receptor-Gi interaction.

## 1.- INTRODUCTION

There is evidence that protein kinase C (PKC) can modulate the function of signalling elements such as some receptor, G-proteins and membrane effectors (adenylate cyclase, phospholipase C and some ion channels) [1]. In platelets it has been observed that activation of PKC by 12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) largely impairs the GTP-dependent hormone-sensitive inhibitory pathway to adenylate cyclase which involves the inhibitory GTP-binding protein, Gi [2-6]. It has been shown that PKC phosphorylates Gi [3] and blocks its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. Interestingly, the ability of hydrolysis resistant GTP analogues to inhibit adenylate cyclase is not altered by the treatment with TPA [5,6] which suggests that the receptor-Gi interaction rather than the Gi-adenylate cyclase interaction is what is altered by PKC. Further support to this interpretation was obtained in binding studies [6], it was observed that in control platelets, approximately 75% of the receptors were in a high-affinity state for epinephrine and approximately 25% in a low-affinity state; Gpp(NH)p shifted the receptor affinity towards the low-affinity conformation [6]. In membranes from TPA-treated platelets, the receptors were in the low-affinity state and no further decrease in affinity was induced by Gpp(NH)p [6]. We examined the effect of TPA on hormone-stimulated GTPase activity; our results indicate that stimulation of PKC markedly diminishes the hormone-stimulated GTPase activity of Gi.

## 2.- MATERIALS AND METHODS

Blood was obtained from healthy men and women who had taken no medication during the previous 2 weeks. Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation. After a preequilibration period of 5 min at 37°C, the platelets were challenged with 1  $\mu$ M TPA, or vehicle for 1 min; the platelets were centrifuged and homogenized. A crude membrane preparation was obtained as described by Hoffman et al. [7].

GTPase activity was assayed according to Cassel and Selinger [8], in a mixture containing 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.1 mM cyclic AMP, 5 mM creatine phosphate, 1.2 mg/ml creatine kinase, 0.2% bovine serum albumin, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 1  $\mu$ M GTP, 50 mM trietanolamine-HCl pH 7.4 and [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]-GTP (0.2  $\mu$ Ci per tube). The reaction was initiated by the addition of the membranes (10  $\mu$ g of protein) and was carried out for 10 minutes or the times indicated at 25°C in a final volume of 0.1 ml. The release of [ $^{32}P$ ]Pi was determined as described by Aktories and Jakobs [9]. Protein was quantified by the method of Lowry et al. [10]. ADP-ribosylation was assayed in a mixture containing 250 mM potassium phosphate buffer pH 7.5, 10 mM arginine, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM ATP, 10 mM thymidine, 0.75 mM NADP, 0.1 mM GTP, 10  $\mu$ M NAD and [ $^{32}P$ ]NAD (10  $\mu$ Ci per tube). The reaction was carried for 60 min at 30°C for 1 hr. Pertussis toxin was activated with 20 mM DTT for 10 min. at 37°C. The reaction was started by the addition of the membranes (100  $\mu$ g); following the reaction 1 ml of phosphate buffer was added and the membranes were pelleted by centrifugation. The pellet was dissolved and subjected to SDS-PAGE. The gels were fixed, dried



and exposed to X-ray film at  $-72^{\circ}\text{C}$  [11].

Immunoprecipitation of  $\text{Gi}\alpha$  was achieved using an specific polyclonal antibody generated against the decapeptide corresponding to as  $\text{Gi}$  (KNNLKDCGLF) [13] essentially as described for  $\text{Gs}\alpha$  [12].

### 3.- RESULTS

Under the conditions employed, basal GTPase activity was linear as a function of time of incubation and of similar magnitude in membranes from control and TPA-treated platelets (Fig. 1). Epinephrine ( $100\ \mu\text{M}$ ) and prostaglandin  $\text{E}_1$  ( $\text{PGE}_1$ ) ( $1\ \mu\text{M}$ ) increased the rate of GTPase activity (Fig. 1). The effect of epinephrine was blocked by yohimbine but not by prazosin indicating the involvement of  $\alpha_2$ -adrenoceptors (data not shown). The effect of  $\text{PGE}_1$  was similar in magnitude in membranes from control or TPA-treated platelets but in contrast, the action of epinephrine was greatly diminished in membranes from TPA-treated cells as compared to the controls (Fig. 1). Dose-response curves (Fig. 2) confirmed this finding; i.e.  $\text{PGE}_1$  stimulated similarly and in dose-dependent fashions, the GTPase activity of membranes from control and TPA-treated platelets; epinephrine induced a dose-dependent GTPase activation in control membranes but only increased GTPase activity at the highest concentration tested ( $100\ \mu\text{M}$ ) in membranes from TPA-treated cells (Fig. 2).

The decreased activation of GTPase activity was not exclusive for epinephrine but common to other agents whose receptors interact with  $\text{Gi}$ , such as platelet activating factor

and thrombin (Table 1).

Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of membranes from control and TPA-treated platelets showed the labeling of  $\approx 41$  kDa protein(s). Interestingly, in membranes from TPA-treated platelets the labeling was consistently decreased 30-50% (Fig. 3). The labeled protein was immunoprecipitated using an specific anti-Gi antiserum (Fig. 3); in the immunoprecipitation the decrease in labeling induced by the treatment with TPA was even clearer (Fig. 3).

#### 4.- DISCUSSION

The findings that activation of PKC in platelets blocks the hormonal inhibition of adenylate cyclase activity [2-6] but not that induced by Gpp(NH)p [5,6] indicated that the receptor-Gi interactions rather than the Gi-cyclase interactions were altered [6]. Further support to this interpretation was obtained in the binding studies [6]. Our current data are consistent with such interpretation; they clearly show that the effect of agents whose receptors activate the GTPase activity of Gi is markedly decreased. In contrast, the stimulation of GTPase activity induced by PGE<sub>1</sub> (putatively via activation of Gs) is not altered which is also consistent with the absence of effect of TPA on the activatory branch of adenylate cyclase [2-6].

We did not observe any effect of the treatment with TPA on the basal GTPase activity. However, "basal" GTPase activity probably is the result of GTP hydrolysis by several G-proteins. Therefore, we can not rule out a direct effect of the treatment on the hydrolytic activity of Gi. Nevertheless, a blockade of the

GTPase activity would probably result in a tonic activation of this G-protein (as it is observed in Gs ADP-ribosylated by cholera toxin [14]); this is not what it is observed.

Current ideas indicate that the hormonal activation of the GTPase activity of G-proteins is probably secondary to the stimulation of the GDP-GTP exchange promoted by their interaction with activated receptors [15]. The perturbation of the receptor-Gi interaction [6] by the treatment with TPA could be responsible for the blockade of the hormonal inhibition of adenylate cyclase [2-6] and activation of the GTPase activity of Gi.

It has been suggested that the C termini of G $\alpha$  subunits governs in part the interaction of G-proteins with receptors [16]. Using a panel of specific antibodies against this domain. Simonds et al [13] were able to block the hormonal inhibition of adenylate cyclase and identified the G-protein involved in this effect as Gi2. Interestingly, the consensus site for pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation is located in the same domain [17]. It is possible that the decreased labeling observed by us with TPA and previously by others using other agents [18] could be due, at least partially, to a perturbation of the C terminus (receptor-coupling domain) of Gi2. Other possibilities such as G-protein subunit dissociation, cannot be ruled out.

The molecular basis of the alteration of Gi2 function remains to be determined. Although in vitro experiments suggested that PKC phosphorylates Gi [3] recent evidence indicates that phorbol esters phosphorylates a G-protein other than Gi [19]. It is interesting to note that it has been shown that TPA blocks Gi

function in liver cells [20] and that this effect is associated to phosphorylation of  $G_i\alpha$  [20] however, the blockade of  $G_i$  function observed in liver cells is different to that observed in platelets. i.e. the inhibitory action of hydrolysis-resistant analogues of GTP is blocked [20].

#### Acknowledgements

The authors thank Ms. Guadalupe Ramírez for typing the manuscript. This reserach was partially supported by a Grant from DGAPA (IN021889).

## REFERENCES

- [1] Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233, 305-312.
- [2] Jakobs, K.H., Bauer, S. and Watanabe, Y. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 425-430.
- [3] Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S. and Jakobs, K.H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 431-437.
- [4] Watanabe, Y., Horn, F., Bauer, S. and Jakobs, K.H. (1985) *FEBS Lett.* 192, 23-27.
- [5] Bauer, S. and Jakobs, K.H. (1986) *FEBS Lett.* 198, 43-46.
- [6] García-Sáinz, J.A. and Gutiérrez-Venegas, G. (1989) *FEBS Lett.* 257, 427-430.
- [7] Hoffman, B.B., Michel, T. Breenneman, T.B. and Lefkowitz, R.J. (1982) *Endocrinology* 110, 926-932.
- [8] Cassel, D. and Selenger, Z. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 452, 538-551.
- [9] Aktories, K. and Jakobs, K.H. (1981) *FEBS Lett.* 130, 235-238.
- [10] Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- [11] García-Sáinz, J.A., Huerta-Bahena, M.E. and Malbon, C.C. (1989) *Am. J. Physiol.* 256, C384-C389.
- [12] García-Sáinz, J.A. and Macías-Silva, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
- [13] Simonds, W.F., Goldsmith, P.K., Codina, J., Unson, C.G. and Spiegel, A.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7809-7813.
- [14] Cassel, D. and Selinger, Z. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4155-4159

- [15] Gilman, A. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615-649
- [16] Masters, S.B., Stroud, R.M. and Bourne, H. R. (1986) *Protein Eng.* 1, 47-54.
- [17] West, R.E., Moss, J., Vaughan, M., Liu, T. and Liu, T.Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 11428-11430.
- [18] Lapetina, E.G., Reep, B. and Chang, K-J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5880-5883.
- [19] Carlson, K.E., Brass, L.F., and Manning, D.R. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 13298-13305.
- [20] Pyne, N.J., Murphy, G.J., Milligan, G. and Houslay, M.D. (1989) *FEBS Lett.* 243, 77-82.

Figure 1

GTPase ACTIVITY OF MEMBRANES FROM CONTROL AND TPA-TREATED PLATELETS. Membranes were incubated in the absence of any agent (circles) or in the presence of 100  $\mu$ M epinephrine (triangles) or 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> (squares). Left panel, (open symbols) control membranes; right panel (closed symbols) membranes from TPA-treated cells. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4 experiments performed in triplicate.

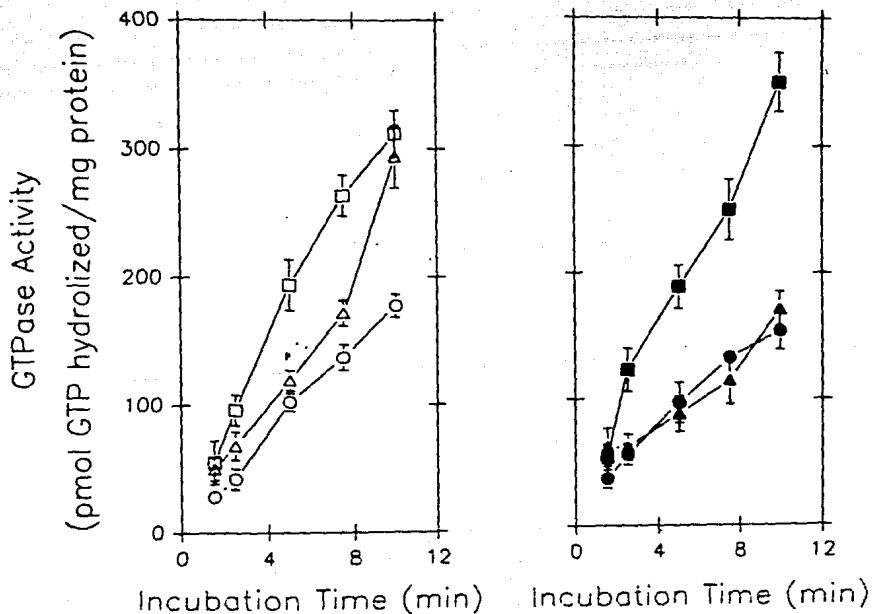


Figure 2

EFFECT OF TPA ON THE STIMULATIONS OF GTPase ACTIVITY INDUCED BY EPINEPHRINE OR PROSTAGLANDIN E<sub>1</sub>.

Membranes from control (open circles) or TPA-treated platelets (closed symbols) were incubated for 10 min with different concentrations of epinephrine or PGE<sub>1</sub>. Results are presented as % of basal activities that were  $18 \pm 3$  and  $15 \pm 3$  pmol. min<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup> for membranes from control and TPA-treated cells respectively. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 10 experiments performed in triplicate.

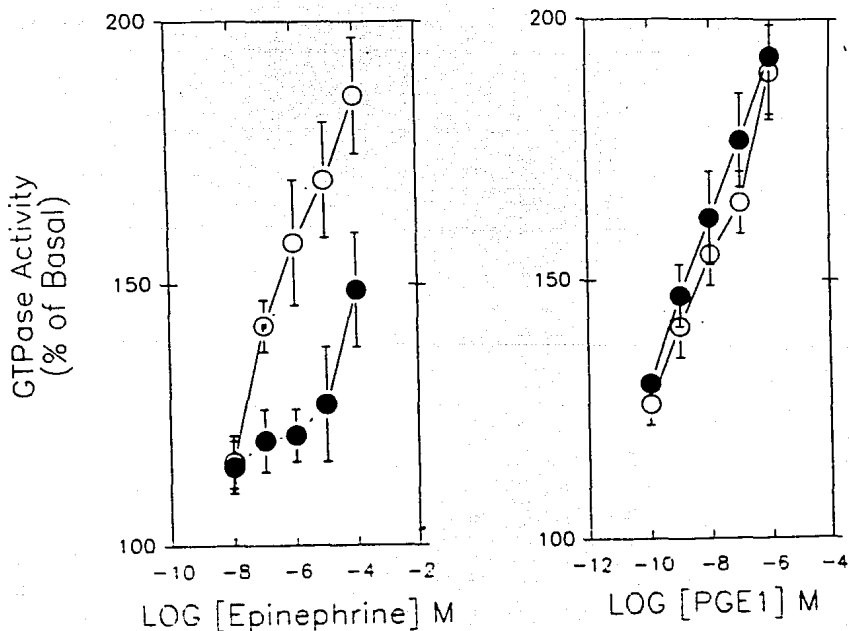




FIG. 3 EFFECT OF TPA ON THE PERTUSSIS TOXIN CATALYZED ADP-RIBOSYLATION IN MEMBRANES FROM CONTROL AND TPA-TREATED PLATELETS. Membranes from control (lines 1,3,5) or TPA-treated platelets (lines 2,4) were incubated in the conditions for [<sup>32</sup>P]ADP-ribosylation in the absence (line 5) or presence of pertussis toxin. (lines 1-4). The membranes were solubilized and either subjected to SDS-PAGE (lines 3-5) or immunoprecipitated using a Gi-specific antibody and the precipitate subjected to SDS-PAGE (lines 1,2). The autoradiogram is representative of 5 with similar results.

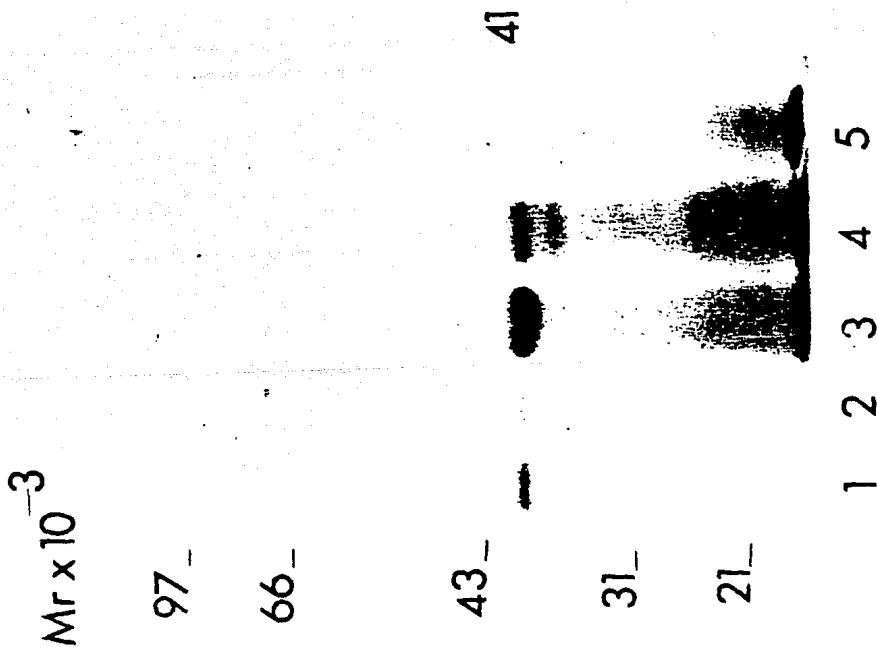
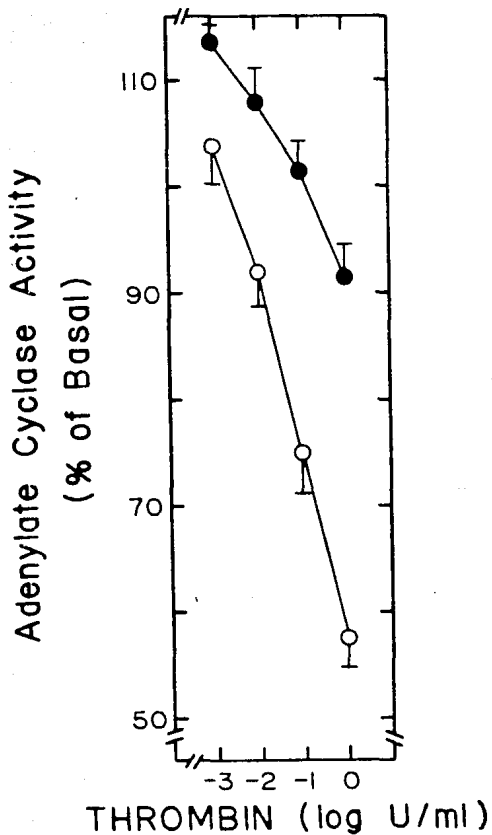


TABLE I. Effects of Epinephrine, Prostaglandin E<sub>1</sub>, Thrombin and Platelet Activating Factor (PAF) on the GTPase activity of membranes from control and TPA-treated platelets. Results are the means  $\pm$  S.E.M. of 4 experiments performed in triplicate. Basal values are the same as in Fig. 2.

Agent	Control	TPA
PERCENTAGE OF BASAL ACTIVITY		
Epinephrine 100 $\mu$ M	172 $\pm$ 7	144 $\pm$ 7 <sup>a</sup>
PGE <sub>1</sub> 1 $\mu$ M	191 $\pm$ 10	198 $\pm$ 8
PAF 100 nM	145 $\pm$ 7	124 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
Thrombin 1 u/ml	141 $\pm$ 8	120 $\pm$ 3 <sup>b</sup>

a p < 0.025

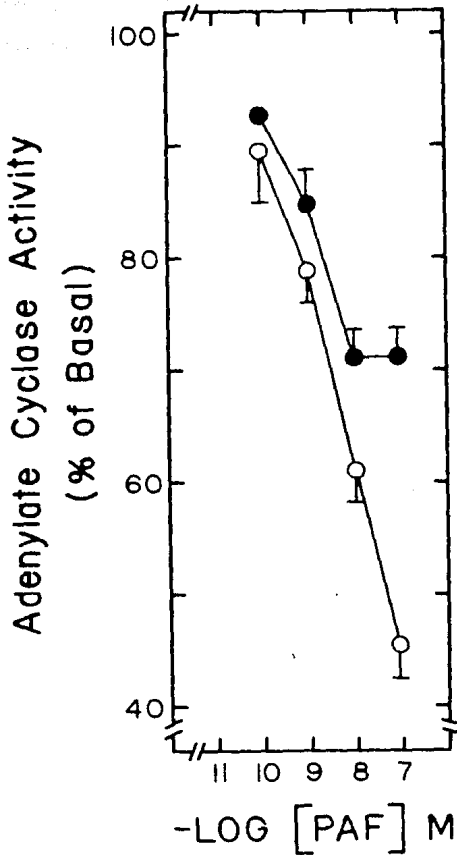
b p < 0.05



DATOS NO PUBLICADOS

Fig.1 Efectos de trombina en la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por forskolina.

Membranas control (círculos abiertos), de plaquetas tratadas con TPA (círculos cerrados), se incubaron con  $100 \mu\text{M}$  de forskolina,  $100 \mu\text{M}$  de GTP y diferentes concentraciones de trombina. Los resultados están expresados como % de la actividad de la adenilato ciclasa observada en presencia de forskolina. Las líneas verticales representan la media del error estándar de 10 experimentos por triplicado.

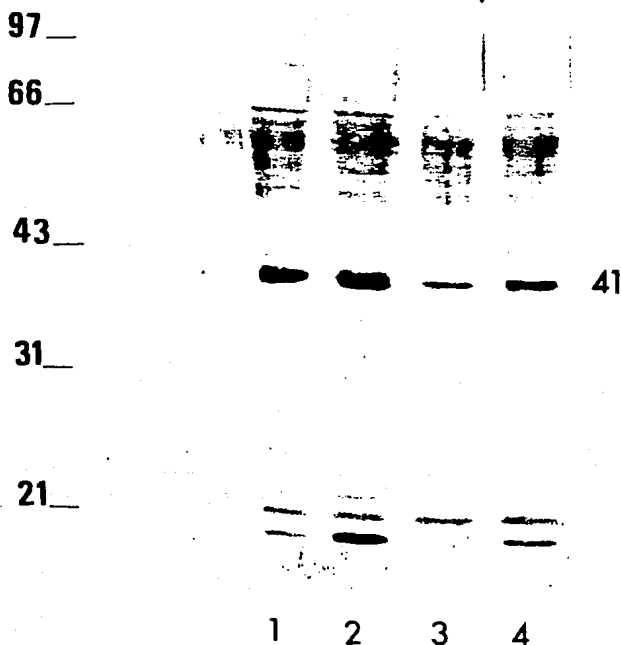


DATOS NO PUBLICADOS

Fig. 2 Efectos de PAF en la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por forskolina.

Membranas control (circuitos abiertos), de plaquetas tratadas con TPA (circuitos cerrados), se incubaron con 100  $\mu\text{M}$  de forskolina, 100  $\mu\text{M}$  de GTP y diferentes concentraciones de PAF. Los resultados están expresados como % de la actividad de la adenilato ciclasa observada en presencia de forskolina. Las líneas verticales representan la media del error estándar de 10 experimentos por triplicado.

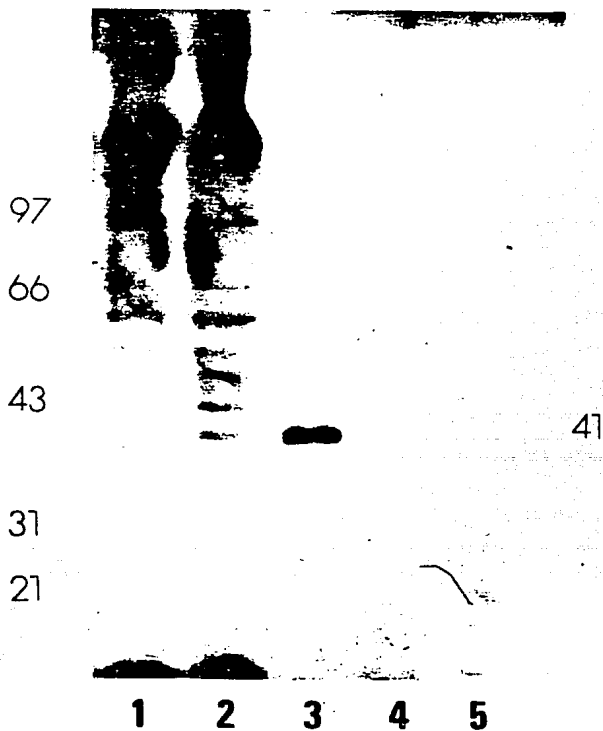
Mr x 10<sup>-3</sup>



DATOS NO PUBLICADOS

Fig. 3 Inmunoblot de las membranas de plaqueta control (líneas 2,4) y de membranas de plaquetas tratadas con TPA (líneas 1,3). Para realizar el inmunoblot se utilizaron métodos convencionales el primer anticuerpo se dirigió contra el decapeptido del carboxilo terminal, la cantidad de proteína se cuantificó con Lowry en las líneas 1,2 100 µg de proteína y líneas 3,4 50 µg de proteína

$M_r \times 10^{-3}$



DATOS NO PUBLICADOS

Fig.4 Fosforilación e inmunoprecipitación de plaquetas incubadas con  $^{32}P$ , línea 1 control; línea 2 plaquetas estimuladas con TPA y ADP-ribosilación catalizada por la toxina pertussis de las membranas de plaqueta control (línea 3), en membranas de plaqueta tratada con TPA (4) y en ausencia de toxina (5). Para la inmunoprecipitación (1,2) las plaquetas se incubaron con  $^{32}P$  durante una hora y media y se estimularon con TPA (2) 1 micromolar durante 1 minuto a 37 grados centígrados. La inmunoprecipitación se efectuó utilizando los anticuerpos dirigidos contra el decapeptido del carboxilo terminal de  $\alpha Gi_2$ .

## RESUMEN DE RESULTADOS

Las conclusiones más significativas obtenidas a partir de los experimentos detallados en la sección anterior podrían sintetizarse de la siguiente manera:

1) Se observó que el tratamiento con TPA afecta el brazo inhibitorio de la adenilato ciclasa, lo que se confirmó con un bloqueo de la inhibición inducida por epinefrina (respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica) (Publicación 1) así como por otros agentes que a través de sus receptores inhiben a la enzima, como PAF y trombina (Datos no publicados).

Se encontró además un bloqueo en la actividad de GTPasa en la proteína Gi por estimulación con epinefrina (Publicación 2).

2) Se demostró así mismo que el tratamiento con TPA no altera el funcionamiento del brazo estimulador de la adenilato ciclasa, lo que se puso en claro al observarse un incremento dependiente de la dosis en la actividad de la enzima al ser estimulada con forskolina (Publicación 1). Se encontró también que la actividad de la GTPasa de la proteína Gs no se veía alterada al ser estimulada con PGE<sub>1</sub>, hormona que se encuentra acoplada de manera estimuladora a la adenilato ciclasa (Publicación 2).

3) Se hizo claro también que el TPA no altera la interacción de la proteína  $G_i$  con la adenilato ciclasa, evidencia que emergió al estudiarse la inhibición con el análogo no hidrolizable del GTP, que es el Gpp(NH)p. Por otro lado es necesario hacer notar que no se presentaron diferencias con respecto a los controles (Publicación 1).

4) Se vio en otro momento que el tratamiento con TPA afecta la afinidad de los receptores  $\alpha_2$ - adrenérgicos con la proteína  $G_i$ . Lo anterior se demostró realizando estudios de asociación y se encontró que por el tratamiento con TPA los receptores presentaron únicamente el estado de baja afinidad (Publicación 1).

5) Se vio así mismo que el tratamiento con TPA actúa sobre  $\alpha$ - $G_{i2}$ . La evidencia anterior fue deducida al observarse un decremento en la ADP-ribosilación de  $G_i$  con toxina pertussis (Publicación 2).

6) Por último fue posible esclarecer que el tratamiento con TPA disminuye el contenido aparente de  $\alpha G_i$ , lo que se puso de manifiesto a través de los estudios con Inmunoblott. De la misma forma, y a través de estudios de fosforilación e inmunoprecipitación, se observó que el tratamiento con TPA induce la fosforilación de una proteína de 41 Kda (No publicado).



## DISCUSION

Como se ha dicho en las páginas anteriores el presente trabajo se fijó como objetivo primordial estudiar la modulación de la respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica en plaquetas con ésteres de forbol(TPA), agente que, según se dijo también, tiene la virtud de estimular la proteína cinasa C. Los datos obtenidos en el curso de la investigación serán analizados ahora a la luz de nuestros propios resultados y los obtenidos en otros laboratorios.

Nuestra información, antes que nada, corroboró los datos obtenidos por el grupo de Jakobs (113,129,139), que encontró que el tratamiento con TPA bloquea la inhibición de la adenilato ciclasa por epinefrina (respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica) (Publicacion 1-fig.2). Las observaciones anteriores sugirieron también que los sustratos posibles de la proteína cinasa C podían ser los receptores inhibitorios, la proteína Gi o bien la propia adenilato ciclasa. La posibilidad de que el sustrato de la cinasa C fueran los receptores se estudió utilizando otros agentes que se encontraron acoplados de manera inhibitoria a la adenilato ciclasa, como el PAF y la trombina.(Datos no publicados-fig.1,2). Se observó también que los mismos agentes bloquean a la adenilato ciclasa de manera similar a como lo hace la epinefrina.

La idea de que los receptores fueran el sustrato de la cinasa introducía una complejidad casi insuperable en vista de que las membranas de plaquetas presentan una cantidad enorme de

receptores acoplados en forma inhibitoria a la adenilato ciclasa, lo que hubiera hecho muy difícil la tarea de la enzima. Otra posibilidad era que la cinasa utilizara como sustrato a las proteínas encargadas de acoplar a los receptores con la adenilato ciclasa, es decir las proteínas  $G_i$ , por lo que se decidió activarla directamente utilizando el  $Gpp(NH)p$ , lo que sorprendentemente permitió encontrar que la inhibición promovida por dicho agente era similar en las membranas control y en las membranas de las plaquetas tratadas con TPA (Publicación 1-fig.2). Los datos anteriores parecían sugerir que la interacción de la proteína  $G_i$  con la adenilato ciclasa no se alteraba por la activación de la proteína cinasa C, aunque esta posibilidad no se descartaba completamente debido a que aún se ignora la forma en que la proteína  $G_i$  ejerce su acción sobre la adenilato ciclasa. Es necesario aclarar que en el curso de tales experimentos no se utilizó el compuesto natural, sino un análogo, que se asocia irreversiblemente a  $G_i$  promoviendo la inhibición de la enzima, como ya ha sido reportado por otros autores, lo que podría oscurecer los efectos del TPA sobre esta interacción. Sin embargo es imperativo recordar que otros investigadores, trabajando con el mismo compuesto (TPA) y en otro sistema (hepatocitos, por ej.) han encontrado diferencias en la inhibición inducida por el  $Gpp(NH)p$ . (142)

Con el objeto de evaluar si la activación de la proteína cinasa C alteraba la funcionalidad de los receptores se realizaron estudios de asociación con  $[^3H]$ -Yoimbina y se encontró que no se presentaban diferencias ni en la constante

de afinidad para el antagonista ni en el número de sitios disponibles entre las membranas de plaquetas y las mismas membranas tratadas con TPA (Publicación 1-tabla I). Como también existía la posibilidad de que el tratamiento con TPA alterara la interacción del receptor con la proteína  $G_i$  se realizaron estudios de competencia para confirmar o descartar esta última posibilidad. Se encontró, según lo han reportado otros autores (132), una población de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en alta afinidad y receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en baja afinidad. Se vio así mismo que la adición del Gpp(NH)p induce la aparición homogénea de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en baja afinidad en membranas de plaquetas. Al realizar una serie de estudios semejantes en membranas de plaquetas tratadas con TPA y en ausencia de Gpp(NH)p se observó que los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos presentaron una población homogénea de baja afinidad. Por otra parte se observó que en presencia de Gpp(NH)p ya no se presentaban cambios adicionales, lo que indicaba que la activación de la proteína cinasa C con el TPA bloqueaba la interacción del receptor con la proteína  $G_i$ , impidiendo de esta manera que los receptores pudieran inhibir a la adenilato ciclasa (Publicación 1-fig.3). Es importante mencionar que tanto los efectos del TPA en plaquetas como los de la toxina pertussis en otros tipos celulares (139) incrementan los efectos de forskolina al estimular a la adenilato ciclasa (Publicación 1-fig. 1) y evitar la formación de un estado de alta afinidad por agonistas de los receptores que están

acoplados de manera inhibitoria a la adenilato ciclasa (respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica).

Se ha determinado con toda certeza que la subunidad  $\alpha$  de  $G_i$  es la responsable de fijar nucleótidos de guanina e hidrolizarlos. Se vio también que esta actividad de GTPasa activada con epinefrina disminuye en forma notable en membranas de plaquetas tratadas con TPA (Publicación 2-fig.1,2). No sería imposible que esta disminución en la actividad GTPásica se produzca como un efecto del TPA al actuar en la interacción del receptor con la proteína  $G_i$  y que de esta manera bloqueara la acción inhibitoria sobre la adenilato ciclasa y la activación de  $G_i$  a través de su actividad de GTPasa. Aunque todavía no se ha confirmado el mecanismo mediante el cuál la proteína  $G_i$  inhibe a la adenilato ciclasa es factible que al disociarse  $\alpha$  del complejo  $\beta\gamma$  promueva la inhibición sobre la adenilato ciclasa y efectúe de tal manera su actividad de GTPasa y que sea el TPA, finalmente, el que tenga la virtud de bloquear el intercambio del GDP a GTP y de esta manera se detecte el bloqueo en la actividad de GTPasa de  $G_i$ , aunque esta última posibilidad deberá explorarse con mayor profundidad.

Se ha sabido que la toxina pertussis ejerce un efecto de ADP-ribosilación sobre la proteína  $\alpha G_i$ , lo que sucede de manera invariable en un residuo de cisteína localizado cerca del extremo carboxilo. Se sabe también que la activación de la proteína cinasa C con TPA induce la fosforilación de la proteína  $\alpha$  de  $G_i$  libre y que la adición de TPA bloquea la

acción de la adenilato ciclasa (140). La similitud en la acción de ambos agentes mencionados nos orilló a pensar que entre sus efectos se encontraba el de alterar dominios funcionales de  $G_i$ , por lo que se decidió evaluar la ADP-ribosilación con toxina Pertussis, lo que permitió, a su vez, determinar que en membranas de plaquetas tratadas con TPA que la ADP-ribosilación se reducía en forma notable (Publicación 2-fig.3).

Todo lo anterior nos sugirió que la activación de la proteína cinasa C le restaba a  $\alpha G_i$  la posibilidad de actuar como sustrato, lo que se producía mediante un bloqueo en la ADP-ribosilación o bien por la liberación de la subunidad  $\alpha$  a la membrana. Algunos autores han localizado a la subunidad alfa en la fracción citosólica (142). Nosotros, sin embargo, no logramos hacer lo mismo en el curso de la presente indagación, aunque seguimos pensando en la necesidad de efectuar estudios más detenidos para esclarecer el fenómeno. Por otra parte Lapetina y su grupo (147), utilizando membranas de plaquetas y otro éster de forbol, como es el forbol-dibutirato, bloquearon la ADP-ribosilación de la misma forma en que lo hicimos nosotros. Es necesario, decir que otros autores han encontrado que el TPA produce incrementos en la ADP-ribosilación en membranas de plaquetas (148) y neutrófilos (149). La disparidad de estos hallazgos no ha sido explicada a la luz de los conocimientos actuales, pero es importante mencionar que el carboxilo terminal de la subunidad alfa de  $G_i$  es un dominio funcional de gran importancia para la interacción de la proteína G con los receptores. En fecha reciente, además,

William Simmonds y colaboradores, en Bethesda (35), caracterizó a la proteína G involucrada en inhibir a la adenilato ciclasa y encontró que la proteína encargada de promover tales efectos es la subunidad  $\alpha$  de  $G_{i2}$ , por lo que se decidió generar anticuerpos contra el dominio mencionado e inmunoprecipitar a las proteínas ADP-ribosiladas, lo que nos permitió encontrar una consecuente disminución de  $\alpha G_i$  en los índices de ADP-ribosilación. Posteriormente, utilizando los mismos anticuerpos, se hicieron estudios de inmunoblott que permitieron encontrar que en membranas de plaquetas tratadas con TPA se presentaba una disminución aparente en los contenidos de  $\alpha G_{i2}$  (Datos no publicados-fig.3), lo que, a su vez, sugería la posibilidad de que alfa  $G_{i2}$  se hubiera liberado de la membrana o bien que la fosforilación promovida por el TPA convirtiera a tal dominio en un sustrato inadecuado para ser detectado por el anticuerpo. En forma paralela, realizando estudios de fosforilación in vivo, e inmunoprecipitación con el mismo anticuerpo, se encontró que el TPA promueve la fosforilación de una proteína de 41 Kda., lo cuál nos hizo pensar en la posibilidad de que tal proteína fuera  $\alpha G_{i2}$ , aunque no logramos determinarlo con un grado razonable de certeza, ya que es posible que nuestro anticuerpo se entrecruze con alguna proteína G diferente (Datos no publicados-fig.4). Otro grupo de autores(142), utilizando hepatocitos, lograron inmunoprecipitar a  $\alpha G_{i2}$  fosforilada mediante el tratamiento con TPA, pero el anticuerpo que utilizaron era el correspondiente al decapeptido terminal de alfa  $G_t$  para transducina, que difiere de

alfa  $G_{i2}$  en un aminoácido. Los mismos autores han pensado que la fosforilación se produce en el residuo de serina 306, mismo que está asusente en  $\alpha G_1, \alpha G_{i3}$  o  $\alpha G_s$ . Datos similares fueron obtenidos por el grupo de Lapetina utilizando plaquetas y activando a la cinasa con trombina (143). Sin embargo el grupo de Manning (142) no logró detectar la fosforilación de  $\alpha G_i$  en plaquetas, lo que les hizo suponer que la fosforilación se produce sobre  $\alpha G_z$ , proteína que comparte muchas características con  $G_i$  y que no puede ser ADP-ribosilada por la toxina Pertussis por carecer del residuo de cisteína. Los datos anteriores sugieren la necesidad de realizar estudios más profundos que permitan dilucidar si los efectos del TPA sobre alfa  $G_i$  se deben a fosforilación o bien a una proteólisis de esta subunidad.

Es importante mencionar que la activación de la cinasa C con TPA en plaquetas altera o actúa de manera específica sobre el brazo inhibitorio de la adenilato ciclasa, pues la actividad de GTPasa estimulada por Prostaglandina E1 no se altera por el tratamiento con TPA. Sin embargo nuestro laboratorio encontró (150), al utilizar como modelo experimental los hepatocitos, que el TPA es capaz de alterar el brazo estimulador de la adenilato ciclasa así como el brazo inhibitorio del mismo sistema. Lo anterior se puso en evidencia al realizar estudios de ADP-ribosilación con toxina Pertussis en donde se determinó un decremento de la ADP-ribosilación por tratamiento con TPA.

Los experimentos y observaciones detallados en el curso de este trabajo sugieren que la activación de la proteína cinasa c con TPA bloquea los efectos inhibitorios de la adenilato ciclasa, bloquea la actividad de GTPasa por epinefrina (respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica) y altera la interacción entre el receptor y la proteína Gi dejando a los receptores en un estado de baja afinidad. Debe mencionarse así mismo la importancia de la proteína cinasa C en la regulación de los sistemas de transducción, pues como dijimos un poco antes es capaz de regular en forma negativa su propio sistema así como al sistema de la adenilato ciclasa. Por otra parte deberán realizarse estudios más detenidos para sacar de la penumbra los efectos específicos del TPA sobre  $\alpha$ Gi, pues el dominio del carboxilo terminal desempeña un papel de suma importancia, como sustrato, para ser objeto de ADP-ribosilación y funcionar también como posible sustrato de la proteína cinasa C y ser además el sitio de interacción con el receptor.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Snider, S.H. (1985). Sci. Amer. 253 (4): 114-123
- 2.- García Sainz, J.A. (1985). FCE. S.E.P. México 108 pp
- 3.- Ariens, E.J. (1983) Pharmac. Weekb. Sci. Ed. 5: 121-127.
- 4.- Hollenberg, M.D., Cuatrecasas, P. (1979) Receptors: General principles and Procedures, R. O'Brien ed. Plenum Press, New York . Vol 1, 193-214 pp.
- 5.- García-Sainz, J.A. (1987). Mensaje Bioquímico. vol X. 177-210 pp.
- 6.- Rall, T.W., Sutherland, E.W., Berthet, J. (1957) J. Biol. Chem. 224:463
- 7.- Sutherland, E.W. (1972). Science 177: 401-408.
- 8.- Northup, J.K. (1985). Molecular mechanism of transmembrane signalling. Cohen and Houslay eds. elsevier. Netherlands. 91-166 pp.
- 9.- Lefkowitz, R.J. ,Caron M.G. (1988). J. Biol. Chem. 263:4993-4998
- 10.- Ison, L.L., Cragoe, E.J. Jr. ,Limbird, L.E. (1987). J. Biol. Chem. 262:17504-17509.
- 11.- Lefkowitz, R.J. ,Caron, M.G. (1988). J. Biol. Chem. 263:4993-4996.
- 12.- Dixon, R.A.T., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dolhman, H.G., Frielle, T., Bolanoski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Dick., R.E., Munford, R.A., Slater,

- E.E., Sigal, I.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Strader, C.D. (1986). *Nature* 321:75-79.
- 13.- Kobilka, B.K., Dixon, R.A.F., Frielle, T., Dohlman, H. G., Bolanoski, M.A., Sigal, I.S., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, M.G., Lefkowitz R.J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:46-50
- 14.- Kobilka, B.K., Trielle, T., Dohlman, H.G., Bolanowski, M.A., Dixon, R.A.F., Keller, P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987). *J. Biol. Chem.* 262:7321-7327.
- 15.- Frielle, T., Collins, S., Daniel, K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Kobilka, B.K. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7920-7924.
- 16.- Kobilka, B.K., Matzui, H., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, H.O., Lefkowitz, R.J., Regan, J.W. (1987). *Science* 238:650-656
- 17.- Yarden, Y., Rodriguez, H., Wong, S.K.E., Brandt, D.R., Chan, J., Ulrich, A., and Ross, E.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:6795-6799.
- 18.- Stryer, L. (1986). *Annu. Rev. Neurosci.* 9:87-91.
- 19.- Dixon, R. A. F., Sigal, I.S., Candellone, M. R., Register, R.B., Scattergood, W., Rands, E., Strader, D. (1987). *EMBO J.* 6:3269-3275
- 20.- Rubenstein, R.C., Wong, S.K.F., Ross, E.M. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 16655-16660
- 21.- Kobilka, B.K., Kobilka, T.S., Regan, J.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1988). *Science* 240: 1310-1315.

- 22.- Rodbell, M., Birbaumer, L., Pohl, S.L., Krans, H.M.  
(1971). J. Biol. Chem. 246:1877-1882.
- 23.- Rodbell, M., Krans, H.M., Pohl, S. L., Birbaumer, L. (1974).  
J. Biol. Chem. 246:1872-1876
- 24.- Rodbell, M., Lin, M.C., Salomon, Y. (1974). J. Biol. Chem.  
249:59-65.
- 25.- Northup, J.K., Sternwies, P.C., Smigel, M.D., Schliefer,  
L.S., Ross, E.M., Gilman, A.G. (1980). Proc. Natl. Acad.  
Sci. 47:6516-6519
- 26.- Sternweis, P.C., Northup, J.K., Smigel, M.D., Gilman, A.G.  
(1981) J. Biol. Chem. 256:11517-11522.
- 27.- Hildebrandt, S.D., Codina, J., Birbaumer, L. (1984) J.  
Biol. Chem. 259:13178-13185
- 28.- Hescheler, J.W., Rosenthal, W., Trautwien, W., Schultz,  
G. (1987). Nature 325:445-448
- 29.- Ewald, D.A., Sternwies, P.C., Miller, R.J. (1988) Proc.  
Natl. Acad. Sci. 85:3633-3638.
- 30.- Nukada, T., Tamabe, T., Takahashi, H., Noda, M. Haga, K.,  
Haga, T., Ichiyama, A., Kangawa, K., Hiranaga, M.,  
Matsuo, H., Numa, Sh. (1986). FEBS Lett. 197:305-310.
- 31.- Jones, D.T., Reed, R.R (1987) J. Biol. Chem. 262:14241-  
14246.
- 32.- Dines, M., Gierschik, P., Milligan, G., Klee, W., Spiegel,  
A. (1985). Proc. Nat. Acad. Sci. 85: 4095-4099.
- 33.- Goldsmith, P., Gierschik, P., Milligan, G., Unson, G.C.,  
Vinitzky, R., Malich, L.H., Spiegel, A.A. (1987) J. Biol.  
Chem. 262: 14683-14688

- 34.- Simonds, W.F., Golksmith, P.K., Codina, J., Unson, C.G., Spiegel, A.M. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. 86:7809-7813
- 35.- Simonds, W.T., Goldsmith, P.K., Woodard, Ch. J., Unson, C.G., Spiegel, A.M.. FEBS Lett. 249:189-194
- 36.- Codina, J., Yatani, A., Grenel, D., Brown, A.M., Birbaumer, L. (1987). Science 236: 442-447.
- 37.- Codina, J., Olate, J., Abramowitz, J., Mattera, R., Cook, R.G., Birbaumer, L. (1988). J. Biol. Chem. 263:6746-6751
- 38.- Gilman, A.G. (1987). Annu. Rev. Biochem. 56:615-649
- 39.- Katada, T., Northup, J.K., Bokoch, G.M., Ui, M., Gilman, A.G. (1984) J. Biol. Chem. 259:3578-3585.
- 40.- Birbaumer, L., Codina, J., Matttera, R., Cerione, R.A., Hildebrand, J.D., Sunyer, T., Rojas, F.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Iyengar, R. (1985). Molecular mechanism of transmembrane signalling. Cohen and Houslay ed. Elsevier-Netherlands. 3-56 pp.
- 41.- Casey, P.J., Gilman, A.G. (1988). J. Biol. Chem. 263:2577
- 42.- Gilman, A.G. (1984) J. Clin. Invest. 73:1-8
- 43.- Katada, T., Bakoch, G.M., Smigel, M.D., Ui, M., Gilman, A.G. (1984) J. Biol. Chem. 259:3586-3592
- 44.- Salter, R.S., Krinks, M.H., Klee, C., Neer, E.J. (1981). J. Biol. Chem. 256:9830-9833
- 45.- Andreasen, T.J., Heiderman, W., Rozenberg, G.B., and Storm, D.R. (1983). Biochem. 22: 2757-2762.
- 46.- Smigel, M.D. (1986). J. Biol. Chem. 261:1976-1982.
- 47.- Pfeuffer, E., Drehev, R.M., Metzger, H., Pfeuffer, T. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3086-3090.

- 48.- Lehninger, A. (1982). Bioquimica. Omega. Barcelona. 117 pp.
- 49.- Hokin, M.R., Hokin, L.E. (1953) J. Biol. Chem. 203:967
- 50.- Michell, R.H. (1975). Biochim. Biophys. Acta. 415:81
- 51.- Durell, J., Garland, J. and Friedel, R.O. (1969). Science 165:862-865.
- 52.- Berridge, M.J. (1984). Biochem. J. 220:345-360.
- 53.- Dawson, A.P. (1985) FEBS Lett. 185:147-150
- 54.- Dawson, A.P., Comerford, J.G., Fulton, D.V. (1986). Biochem. J. 234:311-315
- 55.- Gill, D. L., Ueda, T. Chieeh, S.H., Noel, M.W. (1986). Nature: 320: 461-464.
- 56.- Crockfort, S. and Gomperts, B.D. (1985). Nature 314:534-536
- 57.- Litosch, I., Wallis, G., Fain, J.N. (1985). J. Biol. Chem. 260:5464-5471
- 58.- Crockcroft, S., Gomperts, B.D. (1985). Nature 314:534-536.
- 59.- Whing, R.J., Popic, U., Jiang, H., Exton, J.H. (1986). J. Biol. Chem. 261:2140-2166
- 60.- Smith, C.D., Lane, B.C., Kasaka, I., Verghese, N.W., Snyderman, R. (1985). J. Biol. Chem. 260:5875-5878
- 61.- Ohta, H., Okajima, T., Ui, M. (1985) J. Biol. Chem. 260: 15771-15780
- 62.- Nakamura, T., Ui, M. (1985). J. Biol. Chem. 260:3584-3593.

- 63.- Rhee, S.G., Shu, P.G., Ryu, S.H., Lee, S.Y. (1989).  
Science 244:546-550
- 64.- Bennett, F.C., Balcarek, J.M., Varrichio, A., Crooke, S.T. (1988). Cell 54: 161-169
- 65.- Suh, P.G., Sung, H.R., Moon, K.H., Suh, H.W., Rhee, S.G. (1988) Cell 54: 161-169
- 66.- Katan, M. (1988) Cell 54: 171-177
- 67.- Stahl, M.L., Ferez, C.R., Kelleher, K.L., Kriz, R.W., Knop, I. (1988). Nature 332:269-272
- 68.- Deckmyn, H., Tu, S.M., Majerus, P.W. (1986) J. Biol. Chem. 261: 16553-16558.
- 69.- Baldesame, J.I., Knipp, M.A., Henderson, M.A., Fisher, G.J. (1988). Biochem. Biophys. Res. Commun. 154: 351-357.
- 70.- Wang, P., Tayoshima, S., Osawa, T. (1987). J. Biochem. 102: 1275-1287.
- 71.- Boyer, J.L., Hepler, J.R., Harden, K.T. (1989). TIPS 121:
- 72.- Williamson, J., Cooper, R.H., Joseph, S.K., Thomas, A.P. (1985). Ann. J. Physiol 248 (Cell Physiol, 17) C-203-216.
- 73.- Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1984). Nature 312:315-321.
- 74.- Nishizuka, Y. (1984) Nature 308:693-698.
- 75.- Berridge, M.J. (1984) Biochem. J. 220 6226:345-360
- 76.- Barekal, A.J., Guillemette, G., Rubin, R., Spat, A., Catt, K.J. (1985). Biochem. Biophys. Res. Commun. 133:532-538.
- 77.- Spat, A., Bradford, P.B., Mc. Kimey, J.S., Rubin, R.P., Putney, J.W. (1986). . Nature 319:514-516

- 78.- Hirata, M., Sasaguri, T., Harrachi, T., Nashimoto, T., Kikita, M., Koga, T. (1985). *Nature* 317:723-725.
- 79.- Brass, L.F., Joseph, S.K. (1985). *J.Biol. Chem.* 260: 15172-15179.
- 80.- Joseph, S.K., Williams, R.J., Corkey, B.L., Matschinsky, F.M., Williamson, J.R. (1984). *J.Biol. Chem.* 259:12952-12955.
- 81.- Waloga, G., Anderson, R.E. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126:59-62
- 82.- Hansen, C.A., Mah, S., Williamson, J.R. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 8100-8103.
- 83.- Irvine, R.F., Moor, R.M. (1986). *Biochem. J.* 24: 917-920.
- 84.- Nishizuka, Y. (1986). *C. Science* 233:305-308.
- 85.- Nishizuka, Y. (1983) *Trends. Biochem. Sci.* 8:13-18.
- 86.- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., Nishizuka, J. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:7603-7609.
- 87.- Lapetina, E.G., Reep, B., Ganong, B.R., Bell, R.M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:1358-1363.
- 88.- Kaibuchi, K., Sano, K., Moshijima, M., Takai, Y., Nishizuka, Y. (1982) *Cell Calcium* 3:323-327.
- 89.- Lapetina, E.G. (1986) *FEBS Lett.* 195:111-114.
- 90.- Castagna, M. et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 7847
- 91.- Yamarishi, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 778 (1983).
- 92.- Otani, S., Matsui, I., Kuramoto, A., Marisawa, S. (1985). *Eur. J. Biochem.* 147:27

- 93.- Watanabe, T., Taguchi, Y., Sasaki, K., Tsuyama, K., Kitamura, Y. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:427
- 94.- Zatz, M. (1985) *J. Neurochem.* 45:637.
- 95.- Degen, J.L., Estrarsen, R.D., Nagamine, Y., Ruch, E. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 12426.
- 96.- Johnson, H.M., Vassallo, T., Torres, B.A. (1985) *J. Immunol.* 134: 967
- 97.- Greenberg, M.E. and Ziff, E.B. (1984) *Nature* 311:433
- 98.- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., Leder, P. (1983) *Cell* 35:603.
- 99.- Burns, L.P., Rozenfurt, E. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116:931.
- 100.- Corvera, S., García-Sainz, J.A. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:1128
- 101.- García-Sainz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T., Tussié-Luna, M.I. (1986). *Biochem. Biophys. Acta* 887:73-79.
- 102.- García-Sainz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1987). *Eur. J. Biochem.* 163:417-421.
- 103.- Leeb-Limberg, L.M.F. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2623.
- 104.- Watson, S.P., Lapetina, E.G. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2623.
- 105.- Orellana, S.A., Solski, P.A., Brown J.H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 5236.
- 106.- Sugden, D., Vanecek, J., Klein, D.C., Thomas, T.P., Anderson, W.B. (1985). *Nature* 314:359-361.



- 107.-Sibley, D.R., Jeffs, R.A., Daniel, K., Nambi, P., Lefkowitz (1986). Arch. Biochem. Biophys. 244:343-381.
- 108.-Bell, J.D., Buxton, I.L.O., Burton, L.H. (1985). J. Biol. Chem. 260:2625-2628.
- 109.-Dascal, N., Lotan, I., Gillo, B., Lester, H.A., Lass, Y. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6001-6007.
- 110.-García-Sainz, J.A., Mendlovic, F., Martínez-Olmedo, M.A. (1985). Biochem. J. 228:277-280.
- 111.-Heyworth, C.M., Whetton, A. D., Kinsella, A.R., Houslay, M.D. (1984). FEBS Lett. 170: 38-42.
- 112.-García-Sainz, J.A., Macias-Silva, M., Sotomayor-Hernández, S.M.T., Torres-Marquez, M.E., Trivedi, D., Hruby, V.J. (1990) Cellular Signalling 2:235-243.
- 113.-Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S., Jakobs, K.H. (1985) Eur. J. Biochem. 151:431-437.
- 114.-Zick, Y., Sagi-Eisenberg, R., Pines, M., Gierschick, P., Spiegel, A.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9294-9297.
- 115.-Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J., Caron M.G. (1987) Nature 327:67-70
- 116.-Yamanishi, J., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Castagna, M., Nishizuka, J. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:778-786.
- 117.-Watson, S.P., Mc Connell, R.T., Lapetina, E.G. (1984) J. Biol. Chem. 259: 13199-13203.
- 118.-Watson, S.P., McConnell, R.T., Lapetina, E.G. (1984) J. Biol. Chem. 259:13199-13203.

- 119.-Bylund, B.D. (1986) The alpha-2 adrenergic receptors (Limbird L.E. ed.) Humana press. New York.
- 120.-Sutherland, E. (1965) Adenyl cyclase and hormone action in pharmacology of cholinergic and adrenergic transmission (Koelle, G.B. , Douglas, W.W. and Carlsson, A, eds.) Mc Millan, New York.
- 121.-Rossum, J.M. (1965) . J. Pharmacol. 17: 202-216.
- 122.-Robison,G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W. (1967) Ann. NY Acad. Sci. 139:703-709
- 123.-Delbarre, B., Schmitt, H. (1973) .Eur. J. Pharmacol. 22:355-359.
- 124.-Fain, J.N., Garcia-Sainz J.A. (1980). Life Sci. 26:1183-1194.
- 125.-Fain,J.N., Garcia-Sainz, J.A.(1980) Life Sci. 26: 1183.
- 126.-Garcia-Sainz, J.A. , Hoffman, B.B., Li, S., Lefkowitz R.J., Fain, J.N. (1980) Life Sci. 27:953-958.
- 127.-Garcia-Sainz, J.A., Li,S., Fain, J.N. (1981) Life Sci. 28:401-405
- 128.-Hoffman, B.B.,Millikin-Kilpatrick, D., Lefkowitz, R.J. (1988). J. Biol. Chem. 255:4645-4652.
- 129.-Jakobs,K.H., Sauer, W.,, Schultz,G. (1976) J. Cyclic Nucl. Res. 2: 381-392.
- 130.-Gierschik, P., Jakobs H.K. (1986). The alpha-2 adrenergic receptor. Mechanisms for inhibition of adenylate cyclase by alpha-2 adrenergic receptors (Limbird L.E. ed.) Humana, New Jersey.

- 131.-Aktories, K., Jakobs, K.H. (1981). FEBS Lett. 130:235-238.
- 132.-Hoffman, B.B., Michel, T., Brenneman, T.B., Lefkowitz R.J. (1982) Endo. 110:926-932
- 133.-Katada, T., Ui, M. (1979). J. Biol. Chem. 254:469-479.
- 134.-García-Sainz, J.A. (1981) FEBS Lett. 126: 306-308
- 135.-Katada, T. and Ui, M. (1982) . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3129-3133.
- 136.-Aktories, K., Schultz, G., Jakobs, K.H. (1983) Nauyn Schimiedebergs Arch. Pharmacol. 324:196-200
- 137.-Murayama, T., Ui, M. (1983). J. Biol. Chem. 258:3319-73236.
- 138.-García-Sainz, J.A., Boyer, J.L., Michel, T., Sawyer, D. Stiles, G.L., Dolhman, H., Lefkowitz, R.J. (1984) FEBS Lett. 172: 95-98.
- 139.-Jakobs, K.H., Bauer, S., Watanabe, Y. (1985). Eur. J. Biochem. 151:425-430.
- 140.-Watanabe, Y., Horn, E., Bauer, S., Jakobs, K.H. (1985). FEBS Lett. 192:23-27.
- 141.-Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S., Jakob, K.H. (1985). Eur. J. Biochem. 151: 431-437.
- 142.-Pyne, N.J., Murphy, G.J., Milligan, G., Houslay, M.D. (1989). FEBS Lett. 243:77-82.
- 143.-Crouch, M.E., Lapetina, E.G. (1988) J. Biol. Chem. 263:3363-3371.
- 144.-Carlsson, K.E., Brass, L.F., Manning, D.R. (1989) J. Biol. Chem. 264:13298-13305.

- 145.-Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.  
(1951) J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 146.-Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies: A laboratory  
manual. USA. Cold Spring Harbor Laboratory pp. 471-510.
- 147.-Lapetina, E.G., Reep, B., Chang, K.J. (1986) Proc. Natl.  
Acad. Sci. 83: 5880-5883
- 148.-Halenda, S.P., Volpi, M., Zavioco, G.B., Sa'afi, R.I.,  
Feinstein, M.B. (1986) FEBS Lett. 204: 342-346.
- 1498.-Matsumoto, T., Molski, T.F.P., Volpi, M., Pelz, C.,  
Kanaho, Y., Becker, E.L., Feinstein, M.B., Naccache,  
P.H., Sha'afi, R.I. (1986) FEBS Lett. 198: 295-300.
- 150.-Hernández-Sotomayor, S.M.T., Macias-Silva, M., Malbon, C.,  
García-Sainz, J.A. (1991) Am. J. Physiol..En prensa.