



030624  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y  
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

“EXPRESION DE LOS PROTO-ONCOGENES  
*c-fos* Y *c-jun* POR LA ACTIVACION DE  
RECEPTORES ADRENERGICOS”.

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA  
(BIOQUÍMICA)

PRESENTA LA BIÓLOGA  
ROCÍO ALCANTARA HERNÁNDEZ

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**“ EXPRESIÓN DE LOS PROTO-ONCOGENES *c-fos* y *c-jun*  
EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES  
ADRENÉRGICOS ”.**

**Biol. Rocío Alcántara Hernández.**

**Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz y con el apoyo de la DGAPA (IN 200193 y IN22596) y del CONACyT (4711-N9406).**

*A Eric.*

*por ser maravilloso  
y el mejor de los hijos.*

*A mis padres*

*María Dolores y Ricardo.  
gracias por su apoyo y confianza constantes.*

*A mis hermanos*

*Miroya, Ricardo y Arturo.  
con todo mi cariño.*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Jesús Adolfo García Sáez por la dirección de este tesis y por sus enseñanzas diarias durante 10 años.*

*Al Dr. Ray Píney Montfort por sus comentarios y sugerencias al trabajo durante los estudios de Maestría, como parte de mi comité tutorial.*

*Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por sus comentarios y sugerencias al trabajo durante los estudios de Maestría, como parte de mi comité tutorial, y por su valiosa ayuda en la elaboración de los esquemas, mil gracias.*

*A los Dres. Fernando Lizzy Castilla, Roberto Coria, Luis Vega Domínguez, Ricardo Rosales y Alejandro García Cavanaci, por su contribución en la revisión crítica del manuscrito.*

*A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a los Dres. Claudia González y José Viquez, por su apoyo en las técnicas de biología molecular y en el cultivo de tejidos e inmunoblots.*

*A la M en C Maana Córdova y a la ZFB Patricia Casas por su amistad y por su ayuda en la elaboración de diagnósticos.*

*A la Sra. Lupita Píney por su apoyo secretarial continuo.*

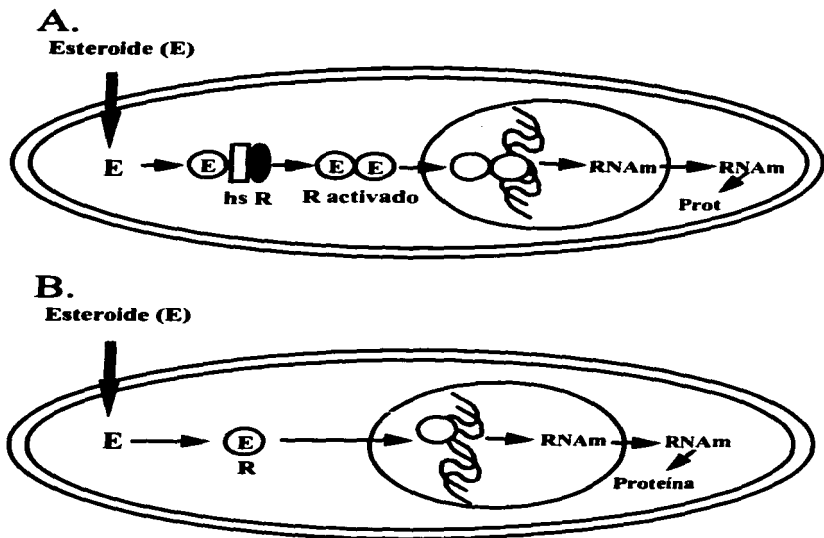
## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I. Receptores</b>	<b>1</b>
a) Receptores citoplásmicos	1
b) Receptores membranales	2
<b>II. Transducción de la señal extracelular</b>	<b>3</b>
<b>III. Sistemas de transducción</b>	<b>3</b>
a) Sistema de la adenilato ciclasa	5
-Receptores	5
-Proteínas Gs y Gi	5
-Adenilato ciclasa (AC)	6
-Proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA)	6
b) Sistema de fosfoinosítidos-calcio (FI-calcio)	7
-Receptores	7
-Proteínas Gq	8
-Fosfolipasa C	8
-Proteína cinasa C (PKC)	9
c) Sistema de la proteína activada por mitógenos (MAPK)	10
-Receptores	11
-Proteínas adaptadoras	11
-p21 Ras	11
-Raf-1, MEK, MAPK	12
<b>IV. Regulación de las vías de transducción, "Crosstalk"</b>	<b>14</b>
<b>V. Adrenérgicos</b>	<b>16</b>
-Receptores adrenérgicos	16
<b>VI. Sistemas de transducción de los receptores adrenérgicos</b>	<b>17</b>
Clasificación de los receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos	18
<b>VII. Estructura de los receptores <math>\alpha_1</math>-adrenérgicos</b>	<b>20</b>
<b>VIII. Sistema de transducción de los receptores <math>\alpha_1</math>-adrenérgicos</b>	<b>21</b>
<b>IX. Antecedentes directos del trabajo de tesis</b>	<b>22</b>

<b>X. Características generales de los proto-oncogenes <i>fos</i> y <i>jun</i></b>	<b>24</b>
a) Familia <i>Fos</i>	
b) Proto-oncogene <i>fos</i>	24
c) Promotor de <i>fos</i>	25
d) Estabilidad del RNAm de <i>fos</i>	26
e) Proteína Fos	26
f) Familia <i>Jun</i>	27
g) Proto-oncogene <i>jun</i>	27
h) Promotor de <i>jun</i>	28
i) Proteína Jun	28
j) Factor de transcripción AP-1	29
k) Regulación del factor de transcripción AP-1	29
<b>XI. Vías de transducción que inducen la expresión de los proto-oncogenes <i>fos</i> y <i>jun</i></b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>34</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES</b>	<b>35</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>35</b>
1. Aislamiento de células de hígado de cuyo	35
2. Cultivo de fibroblastos de pulmón de rata Rat-1	36
3. Aislamiento de RNA total de hepatocitos y células Rat-1	36
4. Purificación de las sondas de DNA: <i>GAPDH</i> , <i>fos</i> y <i>jun</i>	36
a) Obtención de plásmidos	36
b) Obtención de sondas	37
5. Expresión de proto-oncogenes (Dot-blot y Northern blot)	37
a) Dot-blot	37
b) Northern-blot	38
6. Hibridación	38
a) Marcaje de sondas	38
b) Prehibridación	38
c) Hibridación	38
d) Lavado de las membranas hibridadas	38
7. Inmunoblot	
a) Obtención de proteína	39
b) Determinación de proteína	39
c) Electroforesis	39
d) Transferencia de proteínas	39
e) Bloqueo de las membrana	39
f) Incubación con anticuerpos	39



g) Revelado por quimioluminiscencia	40
8. Densitometría	40
<b>RESULTADOS</b>	<b>41</b>
Resumen de resultados	41
Manuscrito 1	
Manuscrito 2	
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>49</b>



**Fig.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES CITOPLÁSMICOS.** Se proponen dos modelos de la forma en que las hormonas esteroideas transducen la señal al núcleo de la célula. **A)** Un modelo explica que la hormona (E) atraviesa la membrana plasmática y se une al receptor oligomérico (R) con alta afinidad y especificidad por su ligando con la participación de una proteína heat shock (hs). que se libera del receptor activado, el cual migra al núcleo en donde se une a una región específica del DNA e induce la transcripción de genes específicos (RNAm). **B)** Otro modelo explica que se requiere un cambio conformacional del receptor inducido por la hormona (E) para que este migre, atraviese la membrana nuclear y se una al DNA. Esquema tomado de la referencia 2.

## **INTRODUCCION**

El tema general de esta tesis, forma parte del área de la comunicación intercelular, y en particular de la comunicación de tipo endocrina.

Existen además, la comunicación paracrina, autocrina y sináptica, que se distinguen entre sí por la forma en que se realizan y por los elementos celulares que participan. Los distintos tipos de comunicación tienen en común que permiten que la célula sea capaz en primer lugar, de percibir cambios en el exterior y en segundo, como consecuencia de ello, de generar una respuesta específica que la lleva finalmente a su adaptación, lo que permite, a su vez, que la(s) célula(s) y por ende los organismos, sobrevivan.

Los mecanismos moleculares que suceden en la célula desde que ésta capta el mensaje extracelular hasta que se produce una determinada respuesta fisiológica se conocen con el término general de comunicación intracelular. Así, por medio de estos mecanismos moleculares, las células, ya sea de forma individual o formando tejidos u órganos, regulan de manera fina funciones esenciales tales como el metabolismo, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación.

Cada célula tiene en su genoma la información necesaria para dar lugar a la expresión de una infinidad de moléculas de naturaleza protéica, que en conjunto y de manera coordinada, participan en la comunicación tanto, intercelular como intracelular.

## **I. RECEPTORES**

Las proteínas clave que participan en el fenómeno de la comunicación celular son los receptores, moléculas que originalmente captan el primer mensajero llámese a este hormona, neurotransmisor, factor de crecimiento o factor antiproliferativo.

A los receptores se les divide en dos grandes grupos por su localización en la célula: a) citoplásmicos y b) membranales.

### **a) RECEPTORES CITOPLÁSMICOS**

Los receptores citoplásmicos so proteínas solubles, sus ligandos y hormonas, algunos de naturaleza lipofílica, atraviesan fácilmente la membrana plasmática para unirse a su receptor específico (Fig.1).

Los ejemplos más claros de este tipo de receptores son los receptores para esteroides, que se clasifican de acuerdo a las respuestas fisiológicas que generan en: a) Glucocorticoides como la corticosterona y el cortisol que afecta el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos; b) Mineral corticoides como la aldosterona que regula la salida de sal y agua por el riñón, y c) Andrógenos y estrógenos, como la testosterona, el  $\beta$ -estradiol y la progesterona que afectan el desarrollo y la función sexual. El otro ejemplo, son los receptores de las hormonas tiroideas: L-tiroxina y L-triiodotironina, o T4 y T3 respectivamente, que estimulan el metabolismo en muchos tejidos (1).

El mecanismo molecular de la acción de este tipo de receptores aún no se conoce en su totalidad (1, 2 y 3). Lo que se sabe, es que estos receptores tienen un papel muy importante como activadores o represores transcripcionales de genes relevantes en el metabolismo, desarrollo y reproducción, algunos de ellos se asocian con proteínas heat shock, otros no (2) (Fig.1). En el caso de los receptores para esteroides, estos en ausencia de hormona se asocian a las proteínas heat shock p70 y p90, complejos que se localizan en el citoplasma o en el núcleo. Los receptores de glucocorticoides (RG) y de andrógenos (RA) se encuentran predominantemente en citoplasma, y los de estrógeno (RE) y progesterona (RP) en núcleo. La unión del ligando permite la disociación de las proteínas heat shock del receptor, la dimerización del receptor y la unión a elementos en el DNA que responden a esteroides (Fig.1), cuya secuencia consenso es la misma excepto por tres nucleótidos. Los RG, RP y RA se unen a la secuencia AGAACAnnnTGTCT, mientras que los RE se unen a la secuencia AGGTCAnnnTGACCT. El dímero de receptores interactúa posteriormente con factores de la transcripción basal, con otras proteínas que se unen al DNA y con coactivadores, resultando en la transcripción de genes (2).

En contraste, los receptores de las hormonas tiroideas, retinoides, vitamina D y ecdisona, en ausencia de ligando, estos se encuentran principalmente en el núcleo en sitios específicos del DNA. Estos receptores forman heterodímeros con receptores retinoides, más que homodímeros, y reconocen sitios que tienen la mitad de la secuencia para los RE, con variaciones en la distribución de los nucleótidos. La unión del ligando y DNA puede causar la disociación de moléculas represoras, seguido a su asociación con otros factores de transcripción, con otras proteínas que se unen al DNA y/o con coactivadores, resultando en la transcripción de genes (2).

Los receptores para esteroides, al menos en algunos sistemas celulares, participan en la regulación del procesamiento del RNA, posiblemente por medio de la producción de proteínas que procesan el RNA y que requieren la maduración del transcrito primario y de esta forma el estímulo hormonal se transforma en una señal nuclear (4).

## **b) RECEPTORES MEMBRANALES**

Los receptores membranales se encuentran embebidos en la membrana plasmática de las células. Existe una gran diversidad de este tipo de receptores con base en su estructura (4):

- 1) Receptores que tienen un dominio transmembranal, como son los receptores para los factores de crecimiento, como por ejemplo, los receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF); receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); para el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ); o para factores con efectos antiproliferativos como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα).
- 2) Receptores con dos dominios transmembranales como son los receptores para la insulina, los cuales tienen dos subunidades α extracelulares de 135 kDa y dos subunidades β intracelulares de 90 kDa con actividad catalítica de cinasa de residuos de

tirosina. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  forman enlaces disulfuro, el receptor es un oligómero  $\alpha 2\beta 2$ .

**3) Receptores de siete dominios transmembranales o receptores serpentina que forman parte de una familia muy numerosa. Estos receptores captan señales tan distintas como por ejemplo, las hormonas epinefrina (adrenalina), vasopresina, angiotensina II, bradikina y bombesina; neurotransmisores como la norepinefrina (noradrenalina), la dopamina o acetilcolina y serotonina; señales visuales (luz) captadas por el receptor de rodopsina, y**

**4) Receptores que están formados por dos o más subunidades transmembranales y que se expresan, básicamente en células del sistema inmune. Algunos ejemplos son los receptores de las citocinas o interleucinas IL-2, IL-3, IL-5 e IL-6; receptores del GM-CSF (GM-CSF del inglés: granulocyte-macrophage colony stimulating factor); o receptores de interferones, como el IF $\gamma$ .**

**5) Receptores de las moléculas de adhesión, entre los que se encuentran las integrinas. Las integrinas son glicoproteínas transmembranales que tienen un papel funcional importante en la regulación y formación de las interacciones célula-matriz extracelular y célula-célula. Cada integrina consta de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , de las que se conocen 8 y 16 formas respectivamente, asociadas entre sí en varias combinaciones. Estos receptores tienen un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico, todos formados por las dos subunidades. El dominio extracelular de la subunidad  $\beta$  tiene una región de 56 cisteínas que se conserva en todas ellas, y por su parte, la subunidad  $\alpha$  tiene sitios de unión al calcio. En el dominio de unión al ligando participan las dos subunidades. La integrina por sí sola no se une a su ligando en células no estimuladas, se requiere de la activación de las plaquetas, por ejemplo, en cuyo caso se observa la participación de cinasas de residuos de tirosina, de cinasas de residuos de serina y treonina y de proteínas G, lo que ocasiona un cambio conformacional del dominio extracelular de la integrina, que permite ahora sí, su unión al fibrinógeno o fibronectina (ligando). Posteriormente la integrina interactúa con proteínas del citoesqueleto tales como la  $\alpha$ -actina, talina, fimbrina, vinculina, tensina y otras.**

Por edición alternativa de los genes correspondientes se generan algunas formas solubles o no membranales de algunos de los receptores antes mencionados. Existen las formas solubles de los receptores para la angiotensina II, IL-1, IL-2, IL-4 e IL-6, TNF $\alpha$ , IF $\gamma$  y GH (GH del inglés: growth hormone)(4).

### ***¿Para qué le sirve a una misma célula expresar tan diversas formas de receptores?***

Una célula responde a una gran cantidad de estímulos del medio gracias a la diversidad de receptores presentes en ésta. Cada receptor activado por su ligando transduce la señal extracelular de una forma particular en donde participan elementos celulares específicos. La activación de diferentes tipos de receptores puede dar lugar al mismo efecto

fisiológico final, pero también cada uno puede generar efectos particulares, ya sea contracción, proliferación, secreción, diferenciación, etcétera, al encender una o más vías específica(s) de transducción.

## II. TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL EXTRACELULAR

La transducción de la señal implica varios procesos moleculares (4): la activación del receptor que provoca cambios conformacionales del mismo; la activación de proteínas de membrana que interactúan físicamente con el receptor y con las proteínas efectoras; la activación de las proteínas efectoras o enzimas que generan las moléculas intracelulares conocidas como **segundos mensajeros**, que tienen como blancos de acción proteínas citoplásmicas que al ser activadas fosforilan (quinasas) o desfosforilan (fosfatasa) a sus sustratos en el citoplasma o en el núcleo de la célula para dar lugar finalmente, a la activación o inhibición de la(s) función(es) celular(es) amplificando así, la señal extracelular.

La activación de todos estos elementos en conjunto, forman las llamadas **cascadas de amplificación de la señal**, cuyo fin en la célula es entonces, la contracción, vasodilatación, división celular, muerte celular, diferenciación, captación de olores, de colores, de sabores, expresión de genes, etcétera, dependiendo del estímulo y del tejido celular.

## III. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN

Se han descrito para los receptores membranales varios **mecanismos o sistemas de transducción de la señal extracelular**. Los siguientes sistemas de transducción son sólo algunos, de los cuales explicaré con detalle tres de ellos por ser importantes en la comprensión del presente estudio:

- el sistema de la adenilato ciclasa,
- el sistema de fosfoinosítidos-calcio,
- el sistema de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK),
- el sistema de activación de los factores de transcripción llamados STAT,
- el sistema de la esfingomielinasa-ceramida, y
- el sistema de receptores que funcionan como canales iónicos, entre otros.

### III. a) SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA.

En el sistema de transducción de la adenilato ciclasa (AC) participan cinco proteínas membranales: los receptores estimuladores (Re), las proteínas G estimuladoras o Gs, los receptores inhibidores (Ri), las proteínas G inhibidoras o Gi y la adenilato ciclasa. La AC es la enzima efectora del sistema, esta genera AMPc, un segundo mensajero, a partir de la molécula de ATP. Uno de los blancos principales del AMPc es la proteína cinasa A (PKA), una cinasa citoplásmica que amplifica la señal extracelular recibida por receptores acoplados al sistema de la AC (Fig.2).

#### RECEPTORES

Numerosos receptores de siete dominios transmembranales tanto, estimuladores como inhibidores, se acoplan a la AC por medio de las proteínas G.

Entre los receptores que estimulan la actividad de la AC por medio de proteínas Gs se encuentran los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y los receptores del glucagon, de la hormona paratiroidea, de la prostaglandina E y de la hormona luteinizante (1). Por otra parte, los receptores que inhiben a la AC y se acoplan a esta por medio de proteínas Gi, son los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos y los receptores de adenosina, entre muchos otros (1).

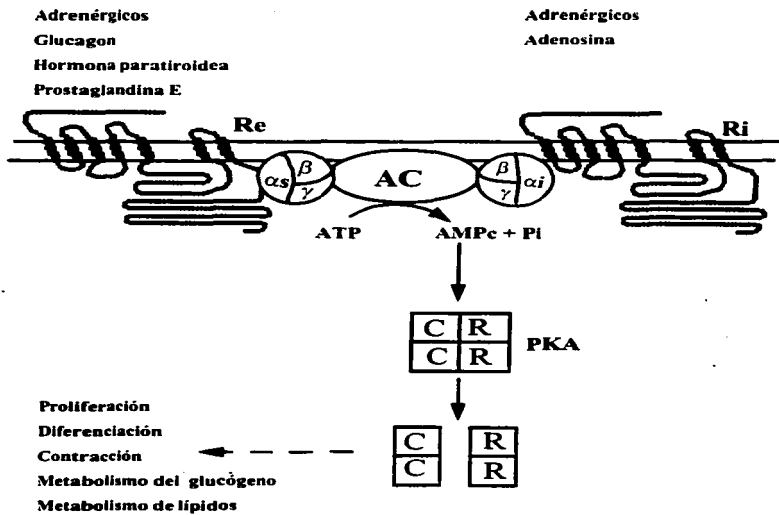
#### PROTEÍNAS Gs y Gi

Las proteínas G unen nucleótidos de guanina, de allí su nombre, son proteínas heterotriméricas formadas por las subunidades  $\alpha$  (40-43 kDa),  $\beta$  (35 kDa) y  $\gamma$  (14 kDa) (5).

La subunidad  $\alpha$  de las proteínas G tiene GDP en su estado inactivo y está unida al complejo  $\beta\gamma$ . La interacción de la proteína G con un receptor activado cataliza el cambio de GDP por GTP y  $\alpha$  se disocia de  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$ -GTP se encuentra en su forma activa y regula la actividad de la AC, esta actividad intrínseca de GTPasa de la proteína G le permite hidrolizar el GTP a GDP, y de esta forma apagar su actividad. El ciclo de hidrólisis de GTP-GDP de las proteínas G inicia una vez más cuando las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  se reasocian nuevamente, esto es cuando  $\alpha$  tiene unido GDP (5 y 6).

A las subunidades  $\alpha$  se les asocia con la activación o inhibición de efectores tales como la AC, la fosfolipasa C (FLC) (5) y los canales de calcio sensibles a voltaje (7 y 8). En el caso de las transducinas o proteínas Gat del sistema visual, se les asocia con la activación de la fosfodiesterasa del GMPc (7).

Al complejo  $\beta\gamma$  que no tiene actividad intrínseca, se le asocia sin embargo, también con un papel fundamental en la transducción de señales. Se le asocia con la activación de la FLC  $\beta$ 3 (9); con la regulación de la vía de la MAPK, ya que promueve la fosforilación de la proteína c-Src y la formación del complejo Shc-c-Src (10); la activación directa de algunos tipos de la AC, y la inhibición de otros (11); la activación de los canales de  $K^+$  (12); y la activación de una FLC citosólica (13); además, las subunidades  $\beta\gamma$  promueven la interacción física entre la proteína G y el receptor (14). Incluso, en el estudio realizado



**Fig.2. SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE LA ADENILATO CICLASA (AC).** Los receptores estimuladores (Re) al ser activados por su agonista activan a la AC que genera adenosín monofósforo cíclico - fósforo inorgánico (AMPc - Pi) a partir del adenosín trifósforo (ATP). Por otra parte, los receptores inhibidores (Ri) al ser activados por su agonista inhiben la producción de AMPc. El AMPc, un segundo mensajero, activa a la proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA) que se disocia en sus subunidades reguladoras (R) y catalíticas (C). La PKA fosforila numerosos blancos que participan en distintos fenómenos celulares tales como la proliferación, la diferenciación y el metabolismo del glucógeno y de lípidos (1).



en células de pituitaria de rata de la línea celular GH3, a la subunidad  $\gamma$  y se le designa como la responsable de las diferencias funcionales del complejo  $\beta\gamma$  en la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje (7).

La idea de que  $\beta\gamma$  funciona únicamente como anclaje de la proteína G a la membrana plasmática ha quedado atrás.

Al menos dieciséis formas de subunidades  $\alpha$  son codificadas por genes distintos y esta gran diversidad de formas aumenta por edición alternativa (7). De las subunidades  $\beta$  se conocen cuatro y de las  $\gamma$  se conocen cinco, tres de ellas han sido clonadas (11). La enorme variedad y combinación de formas de las tres subunidades permite a la célula contar con un número grande de proteínas G diferentes.

La cristalización de las proteínas G heterotriméricas es ya un hecho. El grupo de Gilman logró obtener el cristal por difracción de rayos X de la proteína G formada por las subunidades  $\alpha 1 \beta 1 \gamma 2$  (15).

En el sistema de la AC participan dos clases de proteínas G, las **proteínas G estimuladoras o Gs**, las cuales son modificadas covalentemente por ADP-ribosilación en residuos de arginina por la toxina del cólera (6) y, las **proteínas G inhibidoras o Gi**, de las que se conocen Gi1, Gi2 y Gi3 y son ADP-ribosiladas en residuos de cisteína por la toxina *pertussis* (16), ambas toxinas son útiles herramientas en el estudio de la transducción de señales. Otras modificaciones covalentes de estas proteínas son la fosforilación, la palmitoilación y la miristilación. La proteína Gi es fosforilada en residuos de serina y treonina por la proteína cinasa C (PKC) (16) y Gs $\alpha$  en residuos de tirosina en respuesta a EGF (17); tanto Gi como Gs son palmitoiladas y G $\alpha t$  es miristilada (16).

Las proteínas Gs y Gi activas permiten, por un cambio conformacional de las mismas, la interacción física con la AC, de manera que se induce o se bloquea la producción de AMPc.

### ADENILATO CICLASA

Se han descubierto al menos ocho formas de la AC, seis de las cuales fueron clonadas de fuentes de mamífero: AC I, AC II, AC III, AC IV, AC V y AC VI, una forma de *Drosophila* y otra de *Dicotylestium* (18).

La mayoría de formas de la AC son membranales, otras como las de las bacterias son citosólicas. La AC de eucariotes, de 200 a 250 kDa, tiene doce dominios transmembranales divididos en los grupos M1 y M2, cada uno con seis dominios unidos entre sí por una asa intracelular, tanto el extremo amino como el extremo carboxilo de la proteína son intracelulares. Los dominios hidrofóbicos tienen el sitio de activación por la forskolina, un diterpeno soluble en lípidos (18).

En cuanto a las propiedades de regulación de la AC se sabe que algunas formas de mamífero son moduladas positivamente y otras negativamente, por la proteína calcio-

calmodulina, por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ , por inhibidores del sitio P y por la forskolina (18).

### **PROTEÍNA CINASA DEPENDIENTE DE AMPc (PKA).**

La enzima clave en la propagación de la señal extracelular del sistema de la AC es la PKA, esta proteína está formada por dos subunidades reguladoras (R) y por dos subunidades catalíticas (C) (Fig.2). La PKA al ser activada por el AMPc libera las subunidades R de las C que transfieren el fósforo de la posición  $\gamma$  del ATP a sustratos celulares específicos.

En el citoplasma, algunos de los blancos de fosforilación de la PKA son la fosforilasa a, la sintetasa del glucógeno, la fosforilasa b cinasa, la acetil coenzima A-carboxilasa, la lipasa de triacilglicerol y la fosfofructuocinasa-2/fructuosa 2,6-bisfosfato. Estos blancos de fosforilación por la PKA sugieren que el sistema de la AC participa en la síntesis y degradación de glucógeno, en la síntesis de ácidos grasos, en la oxidación de piruvato a acetil-CoA, en la movilización de triacilglicéridos, en la oxidación de ácidos grasos, en la glucólisis y en la gluconeogénesis (1). En el núcleo, la PKA fosforila factores de transcripción tales como el factor CREB (CREB del inglés: cAMP response element binding protein) por lo cual este sistema puede participar en la expresión de genes (4).

De manera particular, a la PKA I se le ha asociado con el control de la proliferación celular, mientras que a la PKA II con el control de la diferenciación (19)

Los fenómenos celulares relacionados con la activación del sistema de la AC como vemos son muchos, este sistema participa en la regulación del metabolismo, de la transcripción de genes e incluso de la memoria (18).

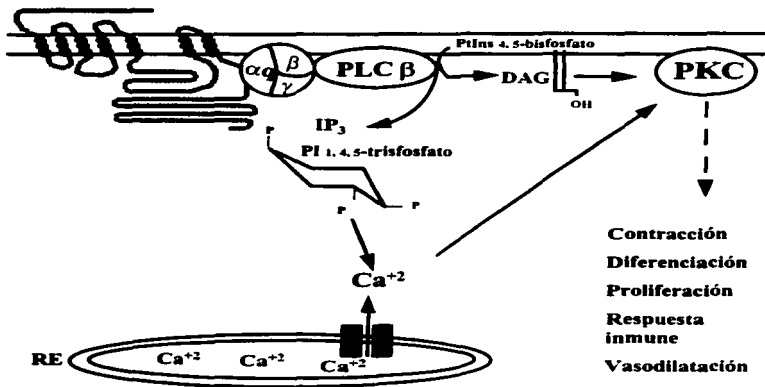
### **III. b) SISTEMA DE FOSFOINOSITIDOS CALCIO**

En el sistema de transducción de fosfoinosítidos-calcio (FI-calcio) participan las siguientes proteínas membranales: receptores estimuladores, proteínas G y proteínas efectoras conocidas como fosfolipasas C que generan dos segundos mensajeros: el 1,2-diacilglicerol (DAG) y el fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>). En este sistema, la proteína cinasa C o PKC, tiene un papel fundamental en la amplificación de la señal extracelular (20) (Fig 3).

#### **RECEPTORES**

Al sistema de FI-calcio pertenecen muchos de los receptores de siete dominios transmembranales (20), entre los que se encuentran los receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos, receptores de vasopresina, angiotensina II, bradicinina, serotonina, muscarínicos,

Adrenérgicos, Muscarínicos.  
 Angiotensina II, Vasopresina.  
 Bradikinina



**Fig.3. SISTEMA DE RECAMBIO DE FOSFOINÓSÍTIDOS-CALCIO (PI-calcio).** Neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento al unirse a sus receptores específicos acoplados a este sistema activan a la proteína Gq heterotrímica y esta a su vez a la fosfolipasa C (FLC<sub>β</sub>). La fosfoliposidadasa genera a partir del fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato (IP<sub>2</sub>) dos segundos mensajeros: el 1,2-diacilglicerol (DAG) y el fosfatidilinositol 1,4, 5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) y el IP<sub>3</sub> al unirse a sus receptores en el retículo endoplásmico (RE) abre canales de calcio lo que provoca un aumento de la concentración intracelular del catión. La PKC fosforila numerosos blancos que participan en distintas respuestas celulares tales como contracción, proliferación y activación de células del sistema inmune. Esquema tomado de las referencias 20, 21 y 29.

dopaminérgicos, receptores de la hormona liberadora de gonadotropina, de trombina, endotelina y del ácido lisofosfatídico, entre otros.

### **PROTEÍNAS Gq**

Las proteínas G heterotrímicas de este sistema de transducción pertenecen a la familia de las proteínas Gq, esta familia está integrada por varios miembros: Gq, G11, G14, G15 y G16, todas estimulan la actividad de la FLC con la que interactúan físicamente (21).

### **FOSFOLIPASA C**

La FLC o fosfoinositidasa hidroliza fosfolípidos de membrana, en especial al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $IP_2$ ) para generar los segundos mensajeros (Fig.3): el DAG, activador natural de la PKC y el  $IP_3$ , mensajero que al unirse a su receptor en el retículo endoplásmico permite la apertura de canales de calcio liberando el catión al citoplasma y elevando su concentración intracelular (21), que en condiciones normales es del orden de  $10^{-7}$  M, nivel que se mantiene debido a la entrada de calcio a la célula por canales operados por ligando dependientes de voltaje; al almacenamiento y liberación de calcio por organelos intracelulares (mitocondrias y retículo endoplásmico) y a la salida de calcio de la célula por una bomba dependiente de ATP predominantemente en células no excitables y por un intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , el cual es muy activo en células excitables (1). La mayoría de los efectores hormonales liberan calcio de almacenes intracelulares y promueven la entrada de calcio extracelular.

De la FLC se conocen tres formas principales; la FLC  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\text{norP}$ ), FLC  $\delta$  ( $\delta 1$ ,  $\delta 2$  y  $\delta 3$ ) y la FLC  $\gamma$  ( $\gamma 1$  y  $\gamma 2$ ). En cuanto a la existencia de una FLC  $\alpha$  hay cierta controversia ya que más bien pareciera por identidad de la secuencia, se tratase de una proteína bisulfuro-oxidoreductasa (21). Algunas evidencias apuntan a la existencia de una nueva familia de FLCs, de la forma  $\epsilon$  (21).

La FLC tiene dos sitios de interacción con la proteína G, el sitio P y el sitio G, sin embargo, sólo las isoformas  $\beta$  y  $\text{norP}$  se acoplan a dicha proteína. La FLC de tipo  $\gamma$  se acopla directamente a los receptores que tienen actividad intrínseca de cinasa de tirosinas, probablemente porque ambas proteínas, FLC  $\gamma$  y receptor, tienen dominios SH2 y SH3 (SH2 y 3 del inglés: *src* homology 2 and 3) (21). Todas las formas de la FLC tienen un dominio PH cerca del extremo amino, llamado así porque este es abundante en la plekstrina, una proteína de las plaquetas. El dominio PH de la FLC está implicado en la unión al  $IP_2$  (22), e incluso para la forma  $\delta 1$  con la unión al  $IP_3$  (23).

La FLC  $\beta$  es activada, como todas las fosfolipasas C por  $G_{\alpha q}$ , pero además por las subunidades  $\beta$  (9).

La actividad de la FLC es de suma importancia, además de generar DAG e  $IP_3$ , reduce la cantidad de  $IP_2$  en la membrana y por lo tanto reduce en ella el número de sitios de unión para proteínas con dominios PH (23).

## PROTEÍNA CINASA C (PKC)

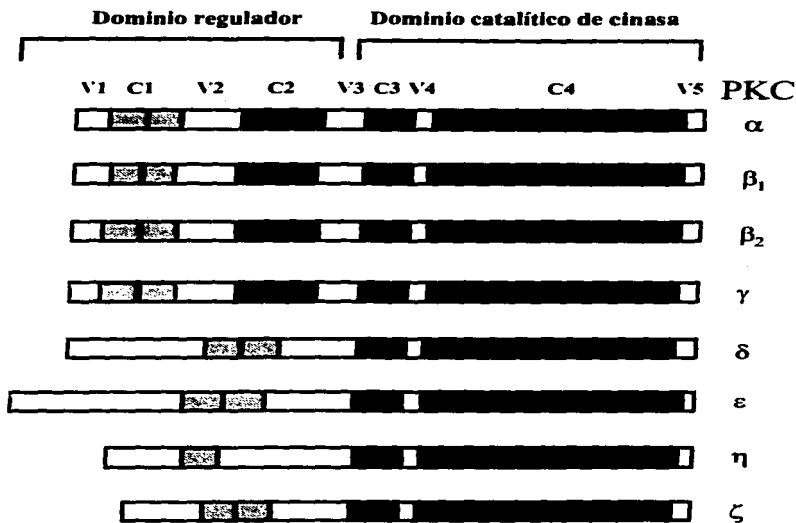
La PKC es la enzima citoplásmica clave que amplifica la señal extracelular en este sistema de transducción, es una cinasa que fosforila residuos de serina y treonina de sustratos que participan en un gran número de fenómenos celulares: contracción, proliferación, diferenciación, respuestas del sistema inmune, proceso inflamatorio, activación de plaquetas, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos (22). El porqué de tantos efectos celulares, quizás se deba a que se trata de una proteína con varias isoformas, y por tanto, a la compleja regulación de su actividad (24).

La PKC es activada vía FLC, pero además vía FLD, enzima que produce ácido fosfatídico a partir de la fosfatidilcolina, y del que se produce posteriormente DAG por la acción de la monofosfoesterasa de ácido fosfatídico. La actividad de la PKC es potenciada vía FLA<sub>2</sub>, enzima soluble, a diferencia de la FLC o de la FLD, que hidroliza fosfolípidos y libera ácidos grasos (ácido araquidónico que se produce a partir del DAG por la DAG lipasa) y lisofosfolípidos (25 y 26). Si bien, la relación intracelular y molecular entre las distintas fosfolipasas que modulan la actividad de la PKC no se conoce aún, si se tienen evidencias suficientes para decir que, la degradación de distintos fosfolípidos es muy importante en la propagación intracelular de la señal por esta cinasa ya que además del DAG, otros fosfolípidos pueden activarla (22, 25 y 26).

Existen al menos doce isoformas de la PKC divididas en tres categorías por sus requerimientos de cofactores: las formas convencionales  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ II y  $\gamma$  que requieren de fosfatidilserina, calcio y DAG; las formas no convencionales  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\sigma$  que no dependen de calcio para su activación y las formas atípicas  $\zeta$  y  $\lambda$  que no requieren ninguno de los cofactores mencionados (25 y 27). Recientemente, se caracterizó en músculo esquelético otra forma  $\alpha$ , PKC  $\alpha$ 2, con diferencias en la especificidad al sustrato (28).

Estructuralmente, las isoformas de PKC tienen cuatro regiones con alta homología (Fig.4), de los dominios C1 a C4, aunque en las isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\eta$  falta el dominio C2 que corresponde al sitio de unión del calcio. El dominio C1 contiene dos secuencias repetidas ricas en cisteínas llamadas dedos de zinc, muy importantes porque son los sitios de unión de los ésteres de forbol, considerados agentes mitogénicos, y a los que se les emplea con mucha frecuencia como activadores artificiales de la PKC ya que mimetizan la acción del DAG sobre la proteína, la PKC  $\zeta$  sólo tiene uno de los dos sitios por lo que no es activada por ésteres de forbol (27). El dominio C1 además, es el probable sitio de unión a la membrana (27); los dominios C3 y C4 se conservan en todas las proteínas de todas las especies (25 y 27), C3 tiene la secuencia de cinasa o sitio catalítico y C4 la región de reconocimiento del sustrato (27). La PKC tiene también cinco regiones variables, de V1 a V5, intercaladas entre las regiones C o constantes (22, 25 y 27) (Fig.4).

La descripción de los mecanismos moleculares de la regulación y función de las distintas isoformas de la PKC pueden contribuir en mucho al estudio de las vías de transducción de señales por las cuales una hormona o factor de crecimiento ejercen sus efectos a nivel del núcleo. La PKC al ser activada migra o se transloca, ya sea a la membrana plasmática o al núcleo de la célula (29), aunque también hay PKC endógena en el núcleo, tanto isoformas dependientes como independientes de calcio (30).



**Fig.4. COMPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA CINASA C (PKC).** Las PKCs tienen cuatro regiones conservadas (C1 a C4) y cinco regiones variables (V1 a V5). La región C1 que corresponde al dominio de unión del diacilglicerol contiene dos secuencias repetidas ricas en cisteínas (la PKC  $\zeta$  tiene solo una copia); C2 es la región de unión del calcio y esta falta en algunas isoformas. Las regiones C3 y C4 contienen la secuencia conservada de todas las cinasas. El extremo amino de las PKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\eta$  es muy variable. Las isoformas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son producto de la edición alternativa de un solo gene. Esquema tomado de la referencia 27.

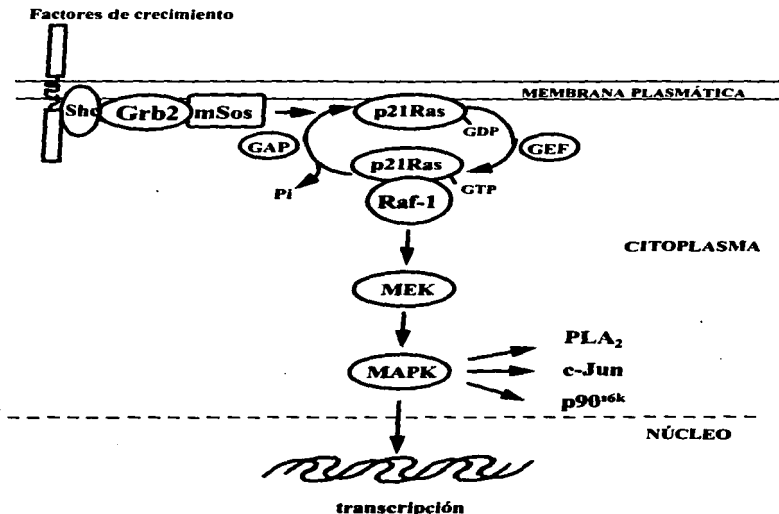
La relocalización de la PKC a la membrana plasmática parece se da por los dominios PH que regulan la interacción proteína-proteína y el anclaje a la membrana (23), el calcio parece regular la unión de la PKC a la membrana, unión que puede ser reversible. Se han caracterizado dos receptores para la PKC llamados RACKS (RACKS del inglés: receptors for activated C-kinase) con diferencias en la afinidad de unión de la PKC, dependiendo de la isoforma (30). Algunas evidencias indican que la translocación de la PKC al núcleo se relaciona con la fosforilación de un gran número de proteínas nucleares y con un aumento en la generación de los fosfoinosítidos nucleares, en particular del DAG. Por otra parte, la activación de la PKC nuclear se acompaña de división celular y de una disminución en los niveles de mono- y di-fosfatidilinositoles en respuesta a bombesina y al factor de crecimiento-1 similar a la insulina (IGF-1) (29).

Las formas convencionales de PKC como la  $\alpha$  o  $\beta$  migran a la membrana plasmática, mientras que las formas no convencionales y atípicas como  $\zeta$ ,  $\delta$  y  $\eta$  migran al núcleo, aunque igualmente las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  también se translocan al núcleo como consecuencia de su activación (4 y 29). La translocación de la PKC parece ser un fenómeno específico de la isoforma, pero en combinación con el papel que desempeña cada una de ellas en la célula.

En un estudio realizado en células de músculo liso de aorta se observó que las isoformas  $\epsilon$  y  $\zeta$  se translocan diferencialmente al ser activadas (31). La PKC  $\epsilon$  se redistribuye en citosol, mientras que la PKC  $\zeta$  se localiza en la región perinuclear, a diferencia de lo que se ha encontrado en células vasculares, en donde la PKC  $\epsilon$  se transloca a la región perinuclear y la PKC  $\zeta$  al interior del núcleo. Estos hallazgos permiten suponer que los mecanismos de contracción-independientes de calcio son, por un lado tejido-específico y por otro que cada una de las isoformas de PKC tiene un papel particular en un mismo proceso celular porque hay una redistribución diferencial de las isoformas  $\epsilon$  y  $\zeta$ , ambas isoformas independientes de calcio.

### **III. e) SISTEMA DE LA PROTEÍNA CINASA ACTIVADA POR MITOGENOS.**

La vía de transducción en la que participa la proteína cinasa activada por mitógenos conocida como MAPK (MAPK del inglés: mitogen activated protein kinase) o ERK (ERK del inglés: extracellular response kinase) se relaciona con la proliferación celular normal, así como con la transformación o proliferación descontrolada de las células. La propagación intracelular de los receptores de crecimiento se da por una cascada de fosforilaciones de distintas cinasas citoplásmicas, y participan además, proteínas adaptadoras entre el receptor que tiene actividad intrínseca de cinasa de tirocinas y una proteína G pequeña llamada Ras (32) (Fig. 5).



**Fig.5. SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA CINASA ACTIVADA POR MITÓGENOS (MAPK).** Los factores de crecimiento al unirse a sus receptores específicos con actividad intrínseca de cinasa de tirosina provocan la autofosforilación y dimerización del receptor. La propagación de la señal ocurre por medio de proteínas adaptadoras con dominios SH2 y SH3 conocidas como Shc, Grb2 y mSos que activa a Ras, proteína G pequeña con actividad de GTPasa. El ciclo Ras-GTP-Ras-GDP es regulado por las proteínas GAP y GEF. Ras-GTP desencadena la activación de una serie de cinasas de serina y treonina llamadas Raf-1, MEK y MAPK. La MAPK fosforila blancos específicos tanto en el citoplasma o una vez translocada al núcleo. La fosforilación de estos sustratos regula la expresión de genes que participan en la proliferación celular. Esquema modificado de la referencia 32.



## RECEPTORES

Los receptores prototipo del sistema de la MAPK son los receptores para factores de crecimiento (33), estos receptores activadores se caracterizan por tener un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular con actividad de cinasa de tirosinas, al cual pueden unirse en diversos sitios proteínas adaptadoras y proteínas con actividad de cinasa (19, 21 y 23). El ligando al unirse a su receptor provoca la dimerización y autofosforilación o transfosforilación del receptor. El cambio conformacional del receptor, consecuencia de la fosforilación permite la exposición de las tirosinas fosforiladas, sitios que son reconocidos por los dominios SH2 de las proteínas adaptadoras, de cinasas tales como Src, de la subunidad p85 de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) o de la FLC  $\gamma$ , importante esta última interacción porque de esta manera los receptores para factores de crecimiento amplifican la señal por medio de segundos mensajeros ya que la FLC y genera DAG e IP<sub>3</sub> (33). La especificidad de unión de cada proteína al receptor está determinada por la secuencia vecina de la tirosina fosforilada, ya sea hacia el extremo carboxilo o hacia el extremo amino (23).

Algunos ejemplos de receptores que se acoplan a la vía de la MAPK son los receptores del EGF, PDGF, del factor de crecimiento neural (NGF), del factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF), del factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ) y del factor-1 estimulador de colonias (CSF-1), entre otros (19).

## PROTEÍNAS ADAPTADORAS

Las proteínas adaptadoras no tienen actividad enzimática, se unen al receptor activo por reconocimiento de sitios fosforilados en residuos de tirosina mediante los dominios SH2, y éstas a su vez, se unen entre sí por dominios SH2 y SH3 (34). Estas proteínas se conocen como Grb2 (Grb2 del inglés: growth-factor-receptor binding protein 2), SOS (SOS del inglés: Son of sevenless) y Shc (Shc del inglés: SH2-domain-containing  $\alpha$ -collagen-related) (23).

Grb2 puede interactuar directamente con el receptor fosforilado de EGF, pero en el caso del receptor de NGF (TrkA), Shc es la proteína que primero se une al receptor y posteriormente se une Grb2-SOS, un complejo constitutivo. Grb2 al unirse al receptor activo deja a SOS localizada en la membrana plasmática donde queda anclada por farnesilación o miristilación, SOS en este lugar estimula la actividad de Ras, proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (23) (Fig.5).

### p21 Ras

La proteína Ras (Ras del inglés: Rat sarcoma virus) se localiza en la cara interna de la membrana plasmática, forma parte de la gran familia de proteínas G ya que tiene actividad intrínseca de GTPasa, pero difiere de las que se acoplan a receptores de siete dominios transmembranales, en que es monomérica y tienen un peso molecular menor, este es de 21 kDa, por lo que se le conoce como una proteína G pequeña, Ras tiene 188 o 189 aminoácidos (23).

Ras es una proteína clave en la amplificación de la señal inducida por los factores de crecimiento, se expresa en todas las células pero, en niveles elevados en células que proliferan.

En células de mamífero existen tres genes *ras* muy similares entre sí: *H-ras*, *N-ras* y *K-ras* con dos variantes generadas por edición alternativa, distintas en el carboxilo terminal, estas son A-Ras y B-Ras. A nivel del RNA mensajero *H-ras* se expresa con niveles altos en piel y músculo, *K-ras* en intestino y timo y *N-ras* en timo y testículo (23).

La forma activa de Ras es Ras-GTP, la unión de GTP permanece por un tiempo aproximado de 30 minutos después de la activación del receptor. La activación y desactivación de Ras, es decir, la hidrólisis de GTP a GDP, es un proceso cíclico regulado por dos proteínas: GAP (GAP del inglés: GTPase-activating protein) y GEF (GEF del inglés: guanine nucleotide exchange factors). Las GAP, de 120 kDa, amplifican la actividad de GTPasa de Ras por lo que son reguladores negativos de Ras y por otro lado, las GEF catalizan la liberación de GTP de Ras (23) (Fig.5).

Se han descrito otras proteínas de la familia de Ras (Tabla de la ref. 23), entre ellas se encuentran las proteínas Rho (Rho del inglés: Ras homologous) y Rac (Rac del inglés: Ras-related C3-botulinum toxin substrate). Rho tiene un papel importante en la regulación de la actina del citoesqueleto, en los contactos focales, en la formación de filopodia y lamelipodia; y Rac además, controla la actividad de la NADPH reductasa en los fagocitos. La proteína Ran participa en el transporte del RNA y de proteínas a través de la membrana nuclear; Rab/YPT regula el tráfico intracelular de vesículas entre los compartimentos y la exocitosis y endocitosis de diferentes tipos de vesículas (23).

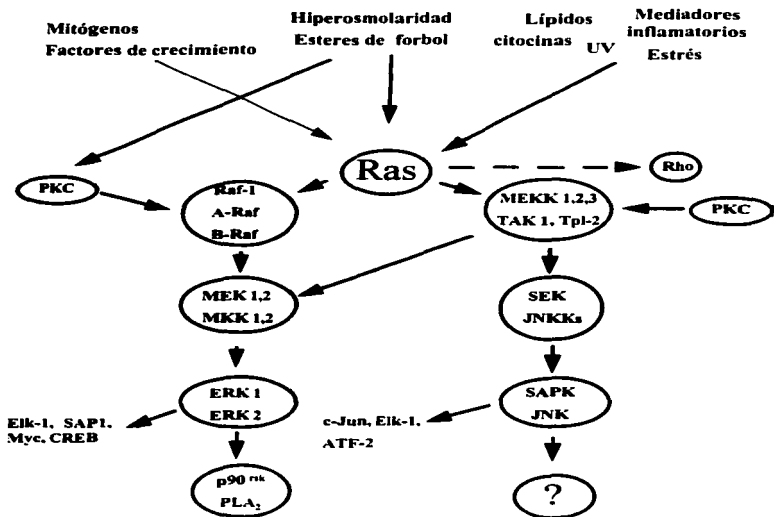
Ras desencadena la activación de una serie de cinasas: Raf-1, MEK1/ MEK2 (cinasa de la MAPK) y MAPK que juntas forman la vía de transducción de los receptores de factores de crecimiento y de los mitógenos. Sin embargo, Ras también desencadena la activación de la vía de los receptores de citocinas en la que participan las cinasas SAPK y JNK (SAPK del inglés: stress activated protein kinase y JNK del inglés: Jun N-terminal kinase); de la vía de las proteínas PAK-1 y p38/RK (PAK del inglés: p21-activated kinase y RK del inglés: reactivating kinase), una vía dependiente de Ras que se enciende en respuesta al estrés (agentes que dañan el DNA como inhibidores de la síntesis de proteínas, luz UV, radiación ionizante, agentes alquilantes, etc.) (23) (Fig.6).

La proteína KSR (KSR del inglés: kinase suppressor of ras) que participa en varias de las vías de cinasas de tirosinas, es importante en la vía de señalización de Ras, al parecer se localiza en el orden de eventos entre Ras y Raf-1 (34).

### **Raf-1, MEK y MAPK**

En la vía de amplificación de la MAPK, la cinasa Raf-1 es activada por Ras (Fig.5), son tres las isoformas de Raf-1: c-Raf-1, A-Raf y B-Raf (23).

Ras interactúa directamente con el extremo amino de Raf-1 que así se relocaliza en la membrana; sin embargo, la activación de Raf-1 también es regulada por fosforilación (32 y 35). Raf-1 es fosforilada, también por PKA, pero esta fosforilación repercute de forma



**Fig.6. VÍAS DE TRANSDUCCIÓN QUE SE ENCIENDEN POR LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA RAS.** La proteína Ras, con actividad intrínseca de GTPasa, es estimulada por una gran variedad de estímulos extracelulares, y son distintas vías de transducción las que participan en sus efectos. Evidencias obtenidas de distintos sistemas celulares de mamífero, muestran que se encienden cascadas específicas de fosforilación que terminan en mitogénesis, diferenciación, regulación del metabolismo, inhibición del crecimiento, organización del citoesqueleto, transporte vesicular, respuesta al estrés, apoptosis y transformación (23). Diversas proteínas, tanto del citoplasma como nucleares y algunos factores de transcripción como Elk-1, c-Myc, CREB, SAP, c-Jun y ATF-2 son fosforilados en respuesta a Ras. Ras es capaz de activar a otras proteínas G de bajo peso molecular llamadas Rho, Rac, Ran entre otras, que participan en la regulación de los contactos focales, actividad de la NADPH reductasa, etc. Esquema simplificado de la referencia 23.

negativa sobre sus actividad, aunque sólo en algunas células (23), igualmente, es fosforilada en la treonina 269 por una cinasa dependiente de ceramida, el segundo mensajero del sistema transducción de la esfingomielinasa-ceramida (36).

En el orden de señalización sigue la cinasa de la MAPK llamada MEK, esta es activada por Raf-1 y por la MAPK, tanto en residuos de serina como de treonina. MEK fosforila tanto residuos de treonina como de tirosina de la secuencia Thr-Xaa-Tyr, donde Xaa es ácido glutámico, prolina o glicina. (23).

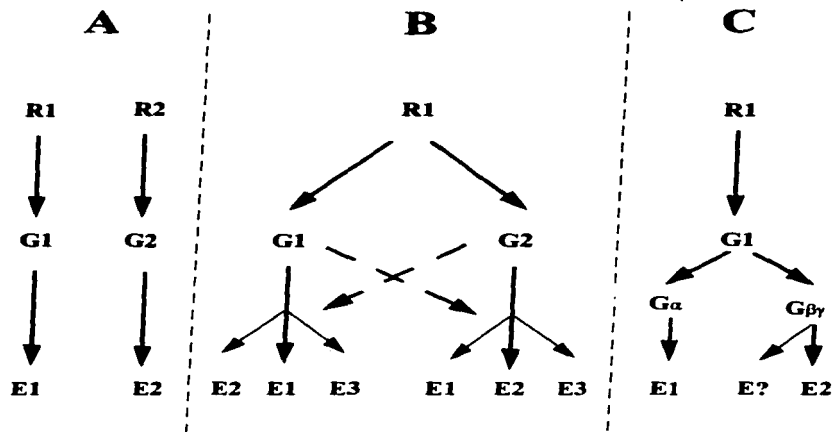
Posteriormente, MEK activa por fosforilación a la MAPK, cinasa que forma parte de una familia de cinasas de serina y/o treonina rodeadas por prolinas, entre las que se incluyen a JNK, SAPK, p38RK y otras ERKs. La MAPK activada migra al núcleo en donde fosforila factores de transcripción específicos tales como c-Jun, SAP-1, Elk-1, c-Myc, ATF2 y CREB (23), los cuales regulan la síntesis de genes específicos, algunos como los proto-oncogenes *fos* y *jun*, relacionados con la proliferación y la diferenciación celular. A la MAPK se le ha asociado con la fosforilación de la cinasa ribosomal S6, de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, del transportador de glucosa y de la cinasa de protamina (23 y 32) (Fig.5) e inclusive de proteínas que se encuentran río arriba en la propia vía de transducción, como la MEK2, el receptor de EGF, SOS y Raf-1, lo que da como resultado la *down-regulation* de la vía. Así por ejemplo, la fosforilación sobre SOS ocasiona que el complejo Grb2-SOS se separe del receptor activado y la señal ya no se transmite a las proteínas subsiguientes (23).

La clonación de la MAPK indica la presencia de las formas p42 (ERK2), p44 (ERK1) y p54, esta última sólo con un 50% de homología en relación con las dos primeras isoformas (32).

En este momento, después de la descripción general de algunos sistemas de transducción, es conveniente mencionar que si bien, cada receptor tiene una manera específica de propagar la señal extracelular en el interior de la célula, ésta no es la única.

Se ha demostrado, tanto en células como en sistemas transfectados, que la activación de un determinado tipo de receptor puede regular la actividad de dos o más efectores y por lo tanto, regular múltiples vías de transducción. Un ejemplo claro son los receptores de siete dominios transmembranales, para los cuales Graeme Milligan (37) analiza los distintos mecanismos moleculares por los cuales estos receptores acoplados a proteínas G transducen la señal en respuesta a un estímulo extracelular, y los agrupa en tres modelos que seguramente serán ampliados con el tiempo (Fig.7).

1. Un modelo explica que las isoformas de un receptor (subtipos) son capaces de interactuar cada uno de ellos con distintas proteínas G, y estas a su vez, de acoplarse a distintos efectores. Algunos ejemplos son los receptores de la hormona liberadora de tirotrópina, de la hormona paratiroidea, de la hormona luteinizante y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, que por un lado activan a la AC al acoplarse a una proteína Gs y por otro lado, receptores diferentes para estas hormonas, activan el sistema de FI-calcio en el cual



**Fig.7. MODELOS PROPUESTOS DE LA TRANSDUCCIÓN DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G.** Al menos tres modelos se proponen para la activación de los receptores de siete dominios transmembranales (ref. 11). **A)** El receptor 1 (R1) acoplado a su proteína G específica (G1) activa a su efector específico (E1); otro receptor distinto (R2) acoplado a su proteína G específica (G2) activa a su efector específico (E2). **B)** R1 puede acoplarse a distintas proteínas G (G1 o G2) de esta manera, activa a los efectores correspondientes (E1 y E2); además, las subunidades de las proteínas G pueden ser intercambiadas entre sí, lo que permite que R1 active a un tercer efector (E3). **C)** El R1 acoplado a G1 tiene dos posibles caminos, uno en el que participa la subunidad con actividad de GTPasa, es decir, G $\alpha$  y otro en el que participa G $\beta\gamma$ ; el primero es el camino tradicional que lleva a la activación de E1, el otro, por medio de  $\beta\gamma$ , activa a E2; además de la posibilidad de activación de otros efectores (E?). Esquema modificado de la referencia 37.

participan las proteínas Gq, es decir cada subtipo de receptor regula la actividad de un efector específico.

2. Otro modelo explica que un solo receptor activa más de una vía de transducción al acoplarse este a distintas proteínas G, que activan a su vez distintos efectores. Así por ejemplo, los receptores de los opiodes- $\delta$  y los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos inhiben la actividad de la AC y los canales de calcio-dependientes de voltaje. En el efecto producido por los receptores de opiodes participa una proteína Go, mientras que en el efecto producido por los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos participa una proteína Gi1, sensible a la toxina *pertussis*.

3. Un tercer modelo explica que un receptor interactúa sólo con una proteína G, pero la señal se bifurca posteriormente en este punto porque las subunidades  $\alpha$  o  $\beta\gamma$  activan o inhiben uno u otro efector. Un ejemplo son los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos que inhiben a la AC y activan a la FLC, se presume que en los dos casos es por medio de la subunidad  $\alpha$  de Gi, y además activan a la FLA<sub>2</sub> por medio de las subunidades  $\beta\gamma$  de la misma proteína Gi.

#### IV. REGULACIÓN DE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN, "CROSSTALK"

Si únicamente tuviéramos en mente que una señal extracelular enciende una vía de transducción, podemos suponer que su regulación es compleja de cualquier manera, dadas las muchas posibilidades de interacción del receptor-proteína G-efector, esto si ponemos como ejemplo a los receptores de siete dominios transmembranales (Fig.7). Sin embargo, la complejidad en la regulación de las vías de transducción aumenta más si consideramos que una célula tiene que responder a varios estímulos a la vez. Las preguntas que surgen entonces son muchas: ¿Cómo una señal puede generar tantos y tan distintos efectos en la célula?, ¿Se enciende sólo una vía, o más de una?, ¿Cómo la célula tiene la capacidad de discernir entre un estímulo u otro y adaptarse a todos los cambios del medio?.

En la década de los 70's surge el concepto de intercomunicación entre las diferentes vías de transducción o *crosstalk* (38), intercomunicación que se da gracias a proteínas y moléculas celulares que son clave, tales como las cinasas (PKC, PKA, MAPK, etc), las fosfatasa y los segundos mensajeros (AMPC, DAG, IP<sub>3</sub>, calcio). Existen numerosas evidencias del *crosstalk* entre los sistemas de la AC y el sistema de FI-calcio, y del *crosstalk* de estos sistemas con otros. Por mencionar algunos ejemplos:

- a) La translocación de la PKC del citoplasma al núcleo de la célula inducida por AMPc (29).
- b) La fosforilación por la PKC de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, acoplados al sistema de la AC (38).
- c) La fosforilación por la PKC de la proteína Gs, de la AC y de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, acoplados inhibitoriamente a la AC (38).

**d)** La disminución en la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc (enzima que degrada al AMPc) por el tratamiento de células hepáticas con ésteres de forbol, activadores de la PKC. (38).

**e)** La desensibilización de las células inducida por glucagon (cuyo receptor se acopla estimulatoriamente a la AC) a hormonas que tienen receptores acoplados al sistema de Fí-calcio, como la angiotensina II y vasopresina (38).

**f)** La fosforilación por la PKC, in vitro, de receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina, como el de insulina y EGF. La fosforilación del receptor de EGF disminuye su actividad de cinasa (38).

**g)** El incremento de los niveles de AMPc, DAG, fosfatidilcolina y ácido araquidónico por la activación del receptor de IL-1, receptor de un dominio transmembranal que no se acopla a proteínas G. Por otra parte, la activación de la PKC por ésteres de forbol disminuye 69% el pegado de la IL-1 a sus receptores, probablemente porque se internalizan. Esto sugiere que el control de los efectores AC, FLC y FLA<sub>2</sub> se da por el "crosstalk" de los sistemas de transducción (38).

**h)** La fosforilación por PKC y PKA de canales iónicos. La PKA fosforila las subunidades  $\gamma$  y  $\delta$  y la PKC fosforila principalmente la subunidad  $\delta$  del receptor nicotínico de acetilcolina (subunidades  $\alpha_2\beta\delta$ ) que además, es fosforilado in vitro e in vivo por una cinasa de tirosinas. PKA y PKC fosforilan la subunidad  $\beta$  del receptor de GABA<sub>A</sub> (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) formado por las subunidades  $\alpha\beta_2$ , lo que sugiere que estos canales iónicos son regulados por los sistemas de la AC y de recambio de Fí-calcio (38).

**i)** La regulación de la vía de la MAPK, positiva por la fosforilación por la PKC de la cinasa Raf-1, y negativa por la fosforilación de la misma por la PKA (22, 32 y 33).

**j)** La activación de la vía de la MAPK, positiva por citocinas, ligandos cuyos receptores se acoplan al sistema de la esfingomielinasa-ceramida por un mecanismo independiente de Ras (39).

**k)** La ceramida, segundo mensajero del sistema de la esfingomielinasa-ceramida inactiva a la PKC $\alpha$  a través de la acción de una fosfatasa (40).

**l)** La PKC fosforila directamente a la  $\beta$ ARK (cinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico) (41), lo que causa su activación y translocación a la membrana (42).

Sin embargo, no obstante que se tienen una infinidad de ejemplos de "crosstalk", la mayoría de las evidencias que se tienen son indirectas. Es tarea aún, el demostrar cuáles son los blancos específicos de cada uno de los elementos cruciales en este fenómeno de la activación intracelular.

## V. ADRENÉRGICOS

El conocimiento acerca de los diferentes tipos de receptores es muy amplio, y lo que se conoce acerca de los receptores adrenérgicos no es la excepción.

Por tratarse de los protagonistas principales del presente trabajo, mencionaré a continuación, y de manera específica las características, vías de transducción, regulación y efectos celulares de los receptores adrenérgicos, con énfasis en el subtipo  $\alpha_1$ -adrenérgico.

La historia de los adrenérgicos es por demás interesante, la celebración reciente de los 100 años del descubrimiento de la epinefrina (adrenalina) y norepinefrina (noradrenalina), hormona y neurotransmisor, respectivamente (43), permiten pensar que un esfuerzo importante está detrás del esclarecimiento de las acciones fisiológicas que tienen estos agentes en diversos tejidos; de la caracterización farmacológica, molecular y bioquímica de sus receptores; así como de la dilucidación de las vías de transducción que estos mensajeros químicos emplean para generar finalmente una respuesta celular.

La epinefrina y la norepinefrina son catecolaminas, es decir aminas fenólicas dihidroxiladas, son los agonistas o activadores naturales de los receptores adrenérgicos. La epinefrina normalmente circula en la sangre con una concentración de  $10^{-10}$  M, la cual en un estímulo de alarma, se eleva hasta 1000 veces en segundos o minutos. Las catecolaminas son secretadas en la porción interna de la médula de la glándula adrenal en respuesta a señales del sistema nervioso central (1).

Los agentes adrenérgicos tienen múltiples efectos en las células, son mediadores importantes de la contracción, relajación, proliferación y de la memoria, por mencionar algunos ejemplos. En particular, la epinefrina incrementa la fuerza y frecuencia del corazón; la presión sanguínea y la dilatación de las vías respiratorias, que en conjunto, incrementan el  $O_2$  liberado a los tejidos, especialmente al músculo. Algunos de los efectos metabólicos de la epinefrina son el incremento en la degradación de glucógeno y la disminución de la síntesis de glucógeno lo que conlleva a un incremento en la producción de glucosa por la gluconeogénesis en el hígado; el incremento de la glucólisis y la movilización de ácidos grasos en el músculo; además, del aumento en la secreción de glucagon y la disminución en la secreción de insulina (1).

¿Por qué tienen tantas y tan diversas acciones los agentes adrenérgicos, inclusive, acciones opuestas?

El descubrimiento de varios subtipos de receptores adrenérgicos, ha permitido acercarnos a la respuesta.

### a) RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Todos los receptores adrenérgicos tienen una estructura general similar, el modelo topográfico de estos receptores predice que se trata de proteínas de siete dominios transmembranales formados por aminoácidos hidrofóbicos acomodados en  $\alpha$ -hélices,



unidos entre sí por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. El extremo amino es extracelular y varía de tamaño de un receptor a otro, mientras que el extremo carboxilo de la proteína es citoplásmico (Fig.8). Todos los receptores adrenérgicos unen los mismos ligandos endógenos (epinefrina y norepinefrina) por lo que se ha postulado que el dominio de unión del receptor al ligando corresponde a los sitios más conservados en la superficie de los dominios transmembranales (44).

Los receptores adrenérgicos tienen modificaciones postraduccionales. En el extremo amino tienen enlaces N-glicosídicos con carbohidratos en residuos de arginina; y tienen también, sitios potenciales de palmitoilación en el extremo carboxilo (44), modificación importante funcionalmente porque regula el acoplamiento del receptor con la proteína G (25) (Fig.8); así mismo, las asas intracelulares de los receptores  $\alpha_{1B}$ - y  $\alpha_{1D}$ - adrenérgicos tienen sitios potenciales de fosforilación por la PKC y PKA (44).

## VI. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN

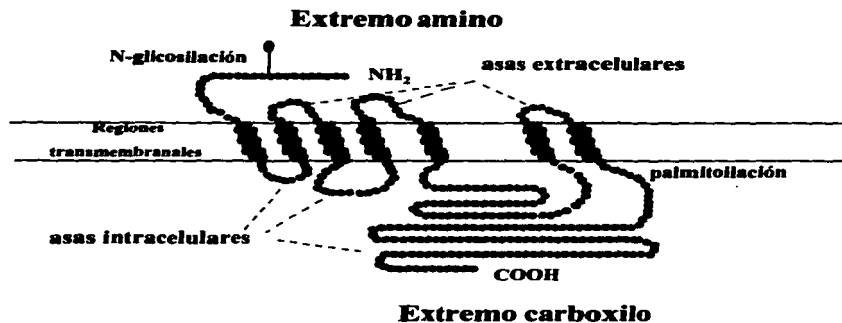
Los distintos subtipos de receptores adrenérgicos modulan, en general, dos sistemas de transducción. Los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se acoplan al sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se acoplan de manera estimulatoria al sistema de la AC y los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos también a la AC, pero inhiben su actividad (43).

## CLASIFICACION

La primera clasificación de los receptores adrenérgicos fue hecha por Ahlquist en 1948 (45) con base a las diferencias observadas en los efectos que generaron seis aminas simpatomiméticas en distintas preparaciones de músculo. Algunas de estas sustancias relajaban y otras contraían el tejido, dependiendo de la concentración empleada. Los primeros receptores adrenérgicos se conocieron como  $\alpha$ - y los segundos como  $\beta$ -adrenérgicos.

Más tarde, Lands et al. en 1967 (46) descubrió la existencia de dos clases de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, el  $\beta_1$  y el  $\beta_2$ . El subtipo  $\beta_3$  se caracterizó muchos años más tarde (47).

En lo que toca a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, Langer et al en 1977 (48) los dividió en receptores presinápticos y postsinápticos por su localización anatómica, clasificación que ya se había sugerido desde 1958 (43). En ese mismo año, en 1977, Berthelsen y Pettinger los dividieron en los subtipos  $\alpha_{1-}$  y  $\alpha_{2}$ -adrenérgicos (49).



**Fig. 8. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS.** Estos receptores tienen siete regiones transmembranales unidas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. El extremo amino de la proteína es extracelular y tiene sitios potenciales de glicosilación, mientras que el extremo carboxilo tiene un sitio potencial de palmitoilación. La tercera asa intracelular y el carboxilo terminal participan en el acoplamiento con la proteína G. En la unión del ligando participan las regiones transmembranales III, IV, V y VI, el Asp 113 de la región III forma un conter-ión para la amina de la adrenalina, el anillo de catecol interactúa con las Ser 204 y 207 de la región V y forma una interacción hidrofóbica con la Phe 290 de la región VI (43).

La clasificación de estos receptores ha crecido gracias a los estudios farmacológicos, bioquímicos y moleculares. Se han descrito, oficialmente, tres grupos de receptores adrenérgicos con un total de nueve subtipos por la IV International Union Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors (50).

RECEPTORES ADRENÉRGICOS	-----	$\alpha_1$	-----	$\alpha_{1a}$
			-----	$\alpha_{1b}$
			-----	$\alpha_{1c}$
	-----	$\alpha_2$	-----	$\alpha_{2a}$
			-----	$\alpha_{2b}$
			-----	$\alpha_{2c}$
	-----	$\beta$	-----	$\beta_1$
			-----	$\beta_2$
			-----	$\beta_3$

#### CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES $\alpha_1$ -ADRENÉRGICOS

La clasificación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ha resultado muy controvertida, a la fecha se han clonado tres subtipos:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1c}$ .

El subtipo  $\alpha_{1c}$ , en un principio descrito, es ahora el subtipo  $\alpha_{1a}$ . El subtipo  $\alpha_{1a}$ , o  $\alpha_{1a/d}$  es actualmente blanco de los estudios de clonación molecular (51).

El receptor  $\alpha_{1b}$  fue el primer receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico caracterizado. En 1988 el grupo de Lefkowitz clonó a este receptor de células de músculo liso de hámster de la línea celular DDT1-MF2 (52). Posteriormente, ya en 1993, fue aislado y caracterizado el gene que codifica este receptor (53).

Los estudios de desplazamiento de unión del ligando radioactivo al receptor, ayudaron a definir que se trataban de dos clases de receptores  $\alpha_1$ , así los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (con alta afinidad,  $pK_D = 9-10$ , por la prazosina un antagonista o agente que bloquea la activación del receptor) se subdividieron en dos subtipos: el  $\alpha_{1a}$ - y el  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico por las diferencias observadas en la afinidad, alta y baja respectivamente, a tres antagonistas competitivos: el benoxatán, WB4101 y fentolamina. Otros agentes farmacológicos permitieron confirmar las diferencias entre los dos subtipos: el 5-metil-urapidil y la (+)niguldipina, ambos antagonistas selectivos del subtipo  $\alpha_{1a}$ ; y la espiperona y risperidona selectivos del  $\alpha_{1b}$  (51).

Tiempo después, entre 1990 y 91, el grupo de Schwinn (54) caracterizó un tercer subtipo, el  $\alpha_{1c}$ . Schwinn describió al receptor  $\alpha_{1c}$ -adrenérgico como un receptor con baja afinidad por el WB4101 y con sensibilidad parcial a la cloroetilclonidina (CEC), un agente alquilante.

Estaban descritos entonces, los subtipos  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1c}$ , sin embargo, al parecer la designación para los receptores  $\alpha_{1a}$  hecha por Lomasney et al. (55) fue prematura. Se ha comprobado que la secuencia propuesta para este receptor no corresponde al subtipo  $\alpha_{1a}$  y a sensibilidad del receptor  $\alpha_{1a}$ -adrenérgico antes mencionado, al 5-metilurapidil, fentolamina, oximetazolina y (+)niguldipina, así como la sensibilidad a la CEC, fueron similares a las que presentaba el receptor  $\alpha_{1c}$  clonado, por lo que a este subtipo se le designa como  $\alpha_{1c}$  (51 y 56).

El grupo de Graham en 1991 (56) descubrió un cuarto subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, al que Schwinn y Lomasney en 1992 (57) denominaron como  $\alpha_{1d}$  o  $\alpha_{1ad}$ -adrenérgico. Esta clasificación se propuso porque el receptor presentó baja afinidad para antagonistas  $\alpha_1$ , en comparación con las afinidades que presentaba el  $\alpha_{1a}$ . Se han caracterizado farmacológicamente los subtipos  $\alpha_{1a}$ -,  $\alpha_{1b}$ - y  $\alpha_{1c}$ -adrenérgicos (58).

La Tabla I ilustra las afinidades y órdenes de potencia de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos para varios agonistas y antagonistas.

	$\alpha_{1a}$	$\alpha_{1b}$	$\alpha_{1d}$
<b>AGONISTAS</b>			
(-)Epinefrina	546	4690	6250
(-)Norepinefrina	100	10500	9730
(+)Epinefrina	18100	32000	43000
Metoxamina	110000	1610000	203000
Fenilefrina	1440	23900	47800
Oximetazolina	2140	842	114
*Orden de potencia	NE > EPI > FENIL > OXI	OXI > EPI > NE > FENIL	OXI > EPI > NE > FENIL
<b>ANTAGONISTAS</b>			
Prasozina	0.33	0.56	0.37
Fentolamina	111	340	15
5-metil-urapidil	0.66	57.2	9.8
WB4101	2.1	28.6	0.68
*Orden de potencia	PRAZ > WB4101 >> FEN	PRAZ >> WB4101 > FEN	PRAZ > WB4101 > FEN

Tabla I. Propiedades de unión de agonistas y antagonistas de los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Valores obtenidos de estudios de competencia con  $1^{125}$  HEAT en células COS-7 transfectadas con los receptores clonados. Las  $K_i$  (constantes de inhibición) se expresan como concentración nM (Tabla modificada de la ref. 44). Los valores de  $K_i$  para el 5-metil-urapidil fueron obtenidos de estudios de competencia con  $^3H$  Prasozina en fibroblastos Rat-1 (Ref.58).

Los genes de los receptores  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1c}$  se localizan en el cromosoma 5 y el del  $\alpha_{1d}$  en el cromosoma 8 (44) y el RNAm de cada uno se expresa en diferentes tejidos (59). La expresión de estos receptores es tejido-específico (44); y aunque todos se acoplan al sistema de Fl-calcio por medio de proteínas G de la familia Gq (60, 61 y 62), se les

relaciona a cada uno, con funciones particulares que dependen del sistema celular (Tabla II).

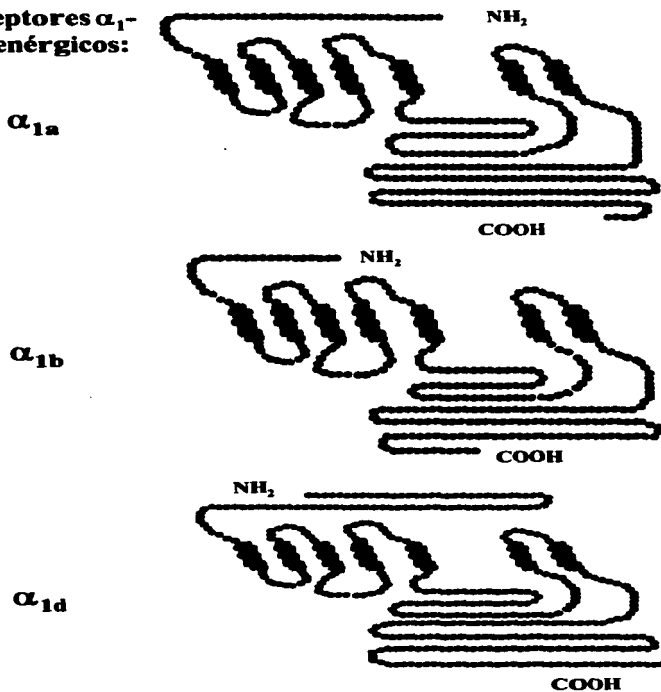
RECEPTORES ADRENÉRGICOS	AMINOÁCIDOS	TEJIDO	EFECTO CELULAR	SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN	REFERENCIA
$\alpha_{1a}$	560	corazón aorta arteria renal	Producción de $IP_3$ , Producción de AMPc,	Fl-calcio Adenilato ciclasa (activación indirecta)	44 63
			Hipertrofia cardíaca, Contracción	Fl-calcio	64
$\alpha_{1b}$	515	hígado cerebro corazón riñón pulmón aorta	Producción de $IP_3$ y calcio,	Fl-calcio	44
			Libерación de ácido araquidónico, Transformación necoplásmica, Producción de AMPc	Fosfolipasa $A_2$  Sobrecarga del receptor Adenilato ciclasa (activación indirecta)	65 66
$\alpha_{1d}$	466	corazón aorta arteria renal	Producción de $IP_3$ y calcio,	Fl-calcio	44
			Libерación de ácido araquidónico, Contracción	Fosfolipasa $A_2$	65 64

Tabla II. Características generales de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y efectos particulares asociados a su activación.

## VII. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES $\alpha_1$ -ADRENÉRGICOS

Al igual que otros receptores adrenérgicos, los  $\alpha_1$  tienen siete dominios transmembranales: I, II, III, IV, V, VI y VII. Tienen seis asas, tres extracelulares y tres intracelulares. La segunda y tercera asas intracelulares, así como parte del carboxilo terminal, también intracelular, participan en el acoplamiento del receptor con la proteína G (67). Los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  tienen un número similar de aminoácidos con pequeñas diferencias en su estructura general (Tabla II y Fig.9), pero el extremo amino, el

**Receptores  $\alpha_1$ -  
adrenérgicos:**



**Fig.9. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LOS SUBTIPOS DE RECEPTORES  $\alpha_1$ -ADRENÉRGICOS.** Los receptores acoplados a proteínas G tienen siete regiones transmembranales unidas entre sí por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. El extremo amino es extracelular y el extremo carboxilo es citoplásmico (44).

extremo carboxilo y la tercera asa intracelular son regiones que difieren mucho en tamaño y composición de aminoácidos (44) (Fig.9).

Al menos los receptores  $\alpha_{1b}$  son fosforilados por la  $\beta$ ARK en respuesta al agonista y esta modificación química causa la desensibilización del receptor (68), es fosforilado por la PKC e igualmente repercute en la funcionalidad del receptor (69). Es interesante que la sensibilidad del receptor a ser fosforilado por la PKC depende del subtipo de receptor (70). Una cisteína conservada en el extremo carboxilo de los tres subtipos es palmitoilada (44).

## VIII. SISTEMA DE TRANSDUCCION DE LOS RECEPTORES $\alpha_1$ -ADRENÉRGICOS

Los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos pertenecen al sistema de FI-calcio, activan a la FLC  $\beta$  por medio de las proteínas Gq (60, 61 y 62), y generan dos segundos mensajeros, el DAG y el  $IP_3$ . Sin embargo, podemos observar en la Tabla II que la activación específica de uno u otro subtipo genera distintos efectos en la célula porque tienen la capacidad de unirse a distintos efectores, de tal manera que además, activan a la FLA<sub>2</sub> por medio de una proteína G sensible a la toxina pertussis (65), activan canales de calcio tipo L sensibles a la dihidropiridina por medio de proteínas G sensibles a la toxina pertussis (65) o inducen proliferación celular cuando el receptor por mutación o sobreexpresión está permanentemente activo (66).

Actualmente, se tratan de esclarecer cuáles vías de transducción son reguladas por los diferentes subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, y cuál es la relevancia fisiológica de su activación, es decir, definir cuál es el receptor que participa en contracción, relajación, proliferación, expresión de genes, etc. Una gran cantidad de trabajos se han realizado sobre el estudio de los efectos celulares a tiempos cortos producidos por los agentes adrenérgicos, enfocados principalmente al metabolismo. Otros trabajos, menos numerosos, se han enfocado al estudio de fenómenos celulares que se observan a plazo largo en respuesta a los adrenérgicos, tales como la síntesis de DNA y la expresión de genes.

A este respecto, se sabe que las catecolaminas estimulan la síntesis de DNA del hígado en regeneración después de una hepatectomía parcial del órgano, efecto que se relaciona con la expresión de genes de inducción temprana (71). Las catecolaminas estimulan la síntesis de DNA, por lo que se sugiere que la activación de receptores adrenérgicos tiene relación directa con la proliferación celular (72 y 73).

Estos trabajos pioneros demuestran, que no sólo los factores de crecimiento o sustancias mitogénicas inducen proliferación celular, sino que de forma similar, hormonas y neurotransmisores inducen el mismo efecto, se llega al mismo fin, aunque sea por caminos distintos, ya que se activan receptores diferentes en cada caso.

## **IX. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL TRABAJO DE TESIS**

Los agentes adrenérgicos por medio de sus receptores controlan numerosas funciones celulares, entre las que se encuentra la expresión de genes. Los agonistas adrenérgicos inducen la transcripción de genes que participan en la homeostasis de la célula. Chin J.H. et al (74) recientemente describió que la activación de los receptores  $\alpha_1$  de aorta de rata lleva a un incremento de la síntesis del RNAm del gene *Hsp 70* cuyo producto es una proteína heat shock, la Hsp70. Las proteínas heat shock participan en un mecanismo homeostático en respuesta a daño metabólico o ambiental. La expresión del gene *Hsp 70* inducida por norepinefrina disminuye con la edad del animal.

El grupo de Zimmer H. G. et al (75), describe que la norepinefrina por medio de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, induce un incremento en los niveles del RNAm de la glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa y también en su actividad como enzima reguladora de la vía oxidativa del ciclo de las pentosas-fosfato. Los autores concluyen que esta respuesta que se observa a tiempos largos puede formar parte de un mecanismo homeostático que mantiene el nivel de nucleótidos de adenina cardíacos en un rango normal.

La estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica induce la expresión del gene de la lipasa de lipoproteínas en adipocitos de tipo café, como una vía auxiliar, ya que la estimulación  $\beta_3$ -adrenérgica es la más importante en la regulación positiva de la expresión de este gene (76).

Además, a través de la estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica se incrementa la transcripción del gene de la  $\alpha$ -actina de músculo esquelético cardíaco durante la hipertrofia del corazón (77) y de la cadena pesada de la  $\beta$ -miosina en los miocitos cardíacos (78).

La activación de los receptores adrenérgicos igualmente, estimula la expresión de genes de inducción temprana, entre los que se encuentran los llamados proto-oncogenes (genes normales que ejercen una regulación positiva sobre el ciclo celular) en diversos tejidos celulares. Los primeros estudios al respecto fueron realizados en células de la glándula parótida de las moscas *Drosophila* y en células del sistema nervioso (79 y 80). El isoproterenol, un agonista  $\beta$ -adrenérgico induce la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *junB* (79) por dos o más vías de transducción. En la glándula parótida, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos además, de inducir la expresión de los proto-oncogenes *fos* y *jun*, inducen la expresión del proto-oncogene *c-abl* que codifica dos proteínas de 150 kDa, diferentes sólo en el extremo amino (80).

En células epiteliales de la línea celular A5, *c-fos* y *jun B* se expresan en respuesta al isoproterenol, pero sólo la expresión de *c-fos* es dependiente del calcio intracelular, lo que sugiere que su expresión es regulada por segundos mensajeros distintos (81).

En células de músculo de la línea celular BC3H1, derivada de un tumor, el proto-oncogene *c-fos* se expresa por la presencia de agonistas  $\alpha_1$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos, tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células (82).



En el corazón, los agentes adrenérgicos tienen un papel primordial en su fisiología. La exposición de células cardíacas a agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos ocasiona cambios rápidos en la contractilidad, en las propiedades electrofisiológicas y en las respuestas metabólicas del miocardio, además, los agonistas adrenérgicos estimulan la producción de fosfoinosítidos, activan la glucogenólisis, inducen un efecto inotrópico positivo relacionado con un incremento en el calcio intracelular, así mismo, inducen tanto, cambios en la expresión de genes relacionados con la hipertrofia cardíaca, especialmente de genes de inducción temprana, como cambios en la expresión de genes marcadores del desarrollo embrionario (83).

En células del miocardio en cultivo, tanto la estimulación  $\alpha$ - como  $\beta$ -adrenérgica, induce la expresión diferencial de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*, expresión que se relaciona con la hipertrofia de los miocitos y más específicamente con el ensamblaje de los sarcómeros durante la contractilidad. *In vivo*, la infusión de isoproterenol por 24 a 72 horas induce la hipertrofia cardíaca a los animales, observada como un aumento en el peso del corazón. Se demuestra que la estimulación de la vía de transducción de la AC activada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos incrementa la expresión transitoria, hasta por 1 hora, de los proto-oncogenes *c-fos*, *fosb* y *junb*. La expresión de *c-jun* y *jund* no cambia en respuesta al agonista (84).

En el tejido adiposo café, la activación de receptores  $\beta$ - y  $\alpha_1$ -adrenérgicos inducen de manera sinérgica la expresión del proto-oncogene *c-fos*, expresión que se relaciona directamente con la proliferación y la diferenciación de estas células (85).

En el hígado en regeneración la expresión de proto-oncogenes se incrementa durante el proceso de proliferación y diferenciación (71 y 86), y lo mismo se observa durante la carcinogénesis hepática (87), o en condiciones normales (88) por la acción de algunas hormonas, sin que se conozca en este último caso el significado que lleva consigo el aumento en la transcripción de algunos proto-oncogenes.

## X. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PROTO-ONCOGENES *fos* y *jun*

### a) FAMILIA *Fos*

El oncogene *v-fos* recibe este nombre porque se aisló originalmente de un osteosarcoma inducido por el virus del sarcoma murino FBJ (Finkel, Biskins y Jinkins) y por el virus transformante de las aves FBR (Finkel, BiiReilly) (89 y 90); *c-fos* es el homólogo celular. *dFRA* y *dJRA* son genes de *Drosophila* relacionados con esta familia de genes (90).

### b) PROTO-ONCOGENE *fos*

Los genes de la familia *Fos* codifican proteínas que conforman el factor de transcripción AP-1 (AP-1 del inglés: activator protein 1).

Los miembros de esta familia de genes son: *fos*, *fosb*, *fosb2* (*fosb2*: *fos b* menos 101 aminoácidos del carboxilo terminal), *fra1* y *fra2* (antígenos relacionados con *fos*) estos últimos detectados por análisis con anticuerpos en preparaciones nucleares de AP-1 (90).

El nivel basal de la expresión del RNAm de *fos* se incrementa después del contacto con un gran número de estímulos extracelulares (Tabla III), lo que sucede a tiempos tan cortos como 5 minutos en algunas células, por lo que se les conoce a estos genes como **genes de inducción temprana**; y la vida media del mensajero es de 30 minutos en promedio, por lo que se les conoce como **genes de expresión transitoria** (Tabla III), expresión independiente de la síntesis de proteínas (90).

<i>fos/Fos</i>	RNAm	PROTEÍNA	Estímulos extracelulares	Tipo celular
	15 a 30 min (vida media)	30 min (vida media)	Luz UV, Suero. EGF, PDGF, FGF	Fibroblastos
	3500 nucleótidos	380 aminoácidos	Neurotransmisores y NGF	Neuronas y células PC12
	14q24.3 (cromosoma humano)		TNF	Células adipogénicas
	12(E-D) (cromosoma de ratón)		IF $\gamma$	Macrófago
			Angiotensina II	Musculo vascular

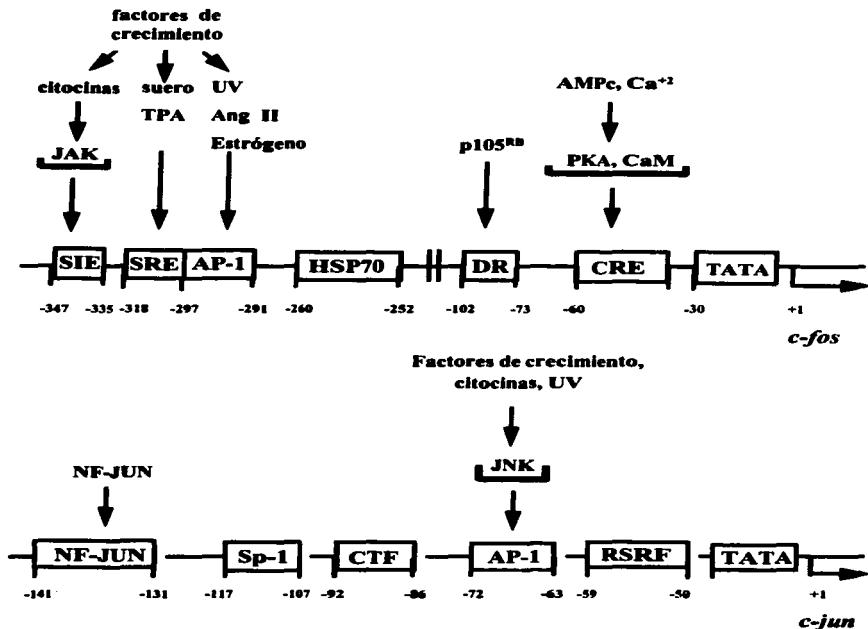
<i>Jun/JUN</i>	4 exones		Estrógeno	Útero de rata
			Endotelina	Células mesangiales
	30 min (vida media)		TGFβ	Miocitos
	1p-32-p31 (cromosoma humano)	331 aminoácidos	Angiotensina II	Músculo liso de aorta
	4 (cromosoma de ratón)		Ácido retinoico	Células Hela
	1 exón		Factor activador de las plaquetas	Células B

**Tabla III.** Características principales de los proto-oncogenes *fos* y *jun* y de las proteínas correspondientes Fos y Jun. Estímulos extracelulares que inducen su expresión.

La transcripción del gene *fos* tiene un alto grado de regulación, la región promotora tiene múltiples secuencias reguladoras positivas y negativas, que responden a diversos estímulos extracelulares (Tabla III y Fig.10).

#### e) PROMOTOR DE *fos*

Las secuencias reguladoras del promotor de *fos* son: la **caja TATA** que va de -26 a -31 pares de bases (pb); **CRE** (CRE del inglés: cAMP response element) en la región de -56 a -63 pb; **DR** (DR del inglés Direct repeat) de -76 a -90 pb, secuencia que junto con CRE se requieren para la transcripción basal del gene. Dentro de esta región, de -73 a -102 pb, *fos* tiene una secuencia que responde al supresor de tumores p105<sup>FB</sup>, producto del gene de retinoblastoma, p105<sup>RB</sup> al unirse al DNA inhibe la expresión del gene. Las secuencias **HSP 70** que van de -235 a -244 pb y de -252 a -260 pb; la secuencia **AP-1**, lo que permite a *fos* autorregular su transcripción (el heterodímero Fos-Jun reprime la transcripción de *fos*); la secuencia **SRE** de -297 a -318 pb (SRE del inglés: serum response element) que se requiere para la activación de la síntesis de *fos* por suero, TPA y factores de crecimiento o por luz ultravioleta (UV); la secuencia **SIE** (SIE del inglés: v-sis-conditioned medium inducible element); **FIRE** (FIRE del inglés: Fos intragenic regulatory element) una región palindrómica que va de 208 a 218 pb en el exón 1 y que participa en la terminación prematura de la transcripción (90 y 91) (Fig.10).



**Fig. 10. SECUENCIAS REGULADORAS DE LOS PROMOTORES DE *fos* Y DE *jun*.** Señales extracelulares que activan o reprimen la transcripción de los proto-oncogenes *fos* y *jun* por medio de las secuencias reguladoras presentes en sus promotores (ver detalles en el texto). Se indican algunas de las proteínas que participan en las vías de transducción que llevan a la expresión de dichos genes: proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaM), factor nuclear de Jun (NF-Jun) y cinasa específica de Jun (JNK) (90).

A la secuencia SRE se une el factor p62<sup>TCF</sup> que interactúa directamente con la región 5' y el factor p67<sup>SRF</sup> para formar un complejo ternario (Fig.11), importante en la activación de la transcripción de *fos*. El factor p67<sup>SRF</sup> es fosforilado por la caseína II cinasa y p62<sup>TCF</sup> por la MAPK (90).

#### d) ESTABILIDAD DEL RNAm de *fos*

La estabilidad del RNAm de *fos*, y así mismo su degradación, parecen ser fundamentales en la transformación de las células.

En la degradación del mensajero, dos regiones ricas en las purinas adenina y uracilo son críticas, una de ellas es una región de 67 pb cercana a tres motivos AUUUA; la otra es una región en el extremo 5' de 0.32 Kb a la que se unen al menos dos proteínas que participan en dicha degradación. Esto lo sugieren estudios realizados *in vitro* en donde se observó que la delección de la zona de 67 pb incrementa el potencial de transformación, mientras que la otra región promueve la degradación del mensajero de *fos*, lo que también detiene la transformación de las células (90).

Los miembros de la familia *Fos* tienen un grado de potencialidad para transformar a las células: *fos b* > *fos* > *fra1* y *fra2*.

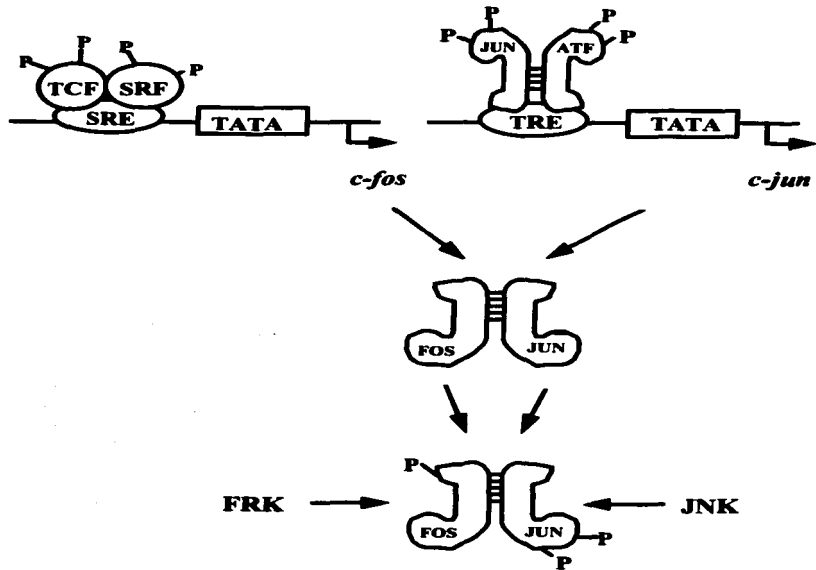
El que *fosb* sea más potente para inducir transformación, con respecto a *fos*, se relaciona con que *fosb* no tiene en el extremo 3' la región potencial de formación de la horquilla de terminación de la transcripción, por lo que el mensajero tiene mayor estabilidad y por tanto, su expresión se observa por más tiempo; además, en *fosb* falta el sitio de fosforilación por la PKA, y esta fosforilación es importante para la estabilidad de la proteína (90).

#### e) PROTEINA Fos

Fos es una fosfoproteína nuclear de 55 kDa producto del proto-oncogene *fos*, forma parte de las vías de señalización que participan en el desarrollo de algunas neoplasias, por lo que se le considera una proteína oncogénica (92).

Fos forma heterodímeros con la proteína Jun por medio de los dominios con cremalleras de leucinas (regiones con 4 o 5 leucinas en serie, separadas por otros 6 aminoácidos), juntos constituyen el factor de transcripción AP-1 que se une al DNA en la secuencia específica TGACTCA llamada AP-1 o TRE (TRE del inglés: TPA response element) (90 y 93). Las proteínas FosB, Fra1, Fra2, JunB y JunD también pueden heterodimerizar con Fos, y es el homodímero Fos-Fos el menos estable (90).

La región carboxilo de Fos es importante en la regulación de la actividad como factor de transcripción, se trata de una región en donde ocurren varias modificaciones postraduccionales, en particular, la fosfoesterificación; es también una región mutada en



**Fig.11. REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Fos Y Jun POR FOSFORILACIÓN.** El producto de los proto-oncogenes *fos* y *jun* son fosforilados en el citoplasma por cinasas específicas de residuos de serina y treonina que pertenecen a la familia de las cinasas MAPKs. Fos es fosforilada por la cinasa de Fos (FRK) y Jun por su parte, es fosforilada por la cinasa específica de Jun (JNK). La transcripción de *fos* es inducida por el complejo ternario de los factores TCF y SRF unidos a la secuencia SRE en el promotor. La transcripción de *jun* es regulada por el complejo Jun-ATF2, el cual se une al sitio regulador AP-1 o TRE. Esquema modificado de la referencia 89.

las proteínas virales oncogénicas FBJ-MuSV y FBR-MuSV (Fig.12); y por otra parte, en las formas truncadas como FosB, aunque éstas sí retienen la capacidad de formar dímeros con Jun, no la de activar la transcripción de los promotores con sitios AP-1, ni tampoco la de reprimir al promotor de *fos* (90).

Otros sitios importantes para la función de Fos son: la glutamina 168, los dominios con cremalleras de leucinas y varios residuos de serina, los dominios HOB1 y HOB2 y el dominio KCR (90).

La glutamina 168 es indispensable para que los homodímeros se unan a la secuencia AP-1. En los dominios con cremalleras de leucinas existen varios sitios de fosforilación y las proteínas Fos que no tienen estos dominios inhiben la transformación inducida por v-Fos y por Ras. Las serinas cercanas al carboxilo terminal en las posiciones 362 a 364, 368, 369, 371 y 373 son fosforiladas por la PKA y por la cinasa p34<sup>cdc2</sup>, ésta última participa en el control del ciclo celular. La serina 362 es fosforilada también, por una cinasa que se activa por el NGF y EGF en células PC12. En el extremo amino, los residuos 59 al 139 son fosforilados por la PKC, por la p34<sup>cdc2</sup> y por una cinasa nuclear. *fos* es fosforilado por la FRK (FRK del inglés: Fos related kinase) (Fig.11).

En el dominio de transactivación Fos tiene los dominios homólogos HOB1 y HOB2 (HOB del inglés: Homologous box) de los cuales HOB1 es fosforilado por la MAPK.

El dominio básico KCR, que comprende de los aminoácidos 53 al 155, tiene una cisteína en la posición 154 que modula la unión al DNA, si la cisteína se encuentra en estado reducido se incrementa la capacidad de unión al DNA y si se reemplaza por serina Fos tiene mayor capacidad de actuar como agente transformante. El dominio KCR se conserva en Fos, Jun y ATF/CREB (90).

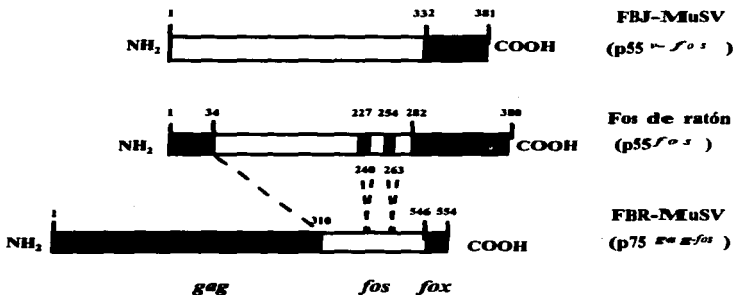
Fos, comparte con los otros miembros de su familia cinco regiones homólogas además, del dominio básico y del dominio con cremalleras de leucinas (90) (Fig.13).

## h) FAMILIA Jun

El nombre de la familia Jun surgió porque el proto-oncogene *v-jun* se aisló originalmente del virus del sarcoma de las aves AVS 17, la palabra *junana* en japonés significa número 17; *c-jun* es el homólogo celular de *v-jun* (90).

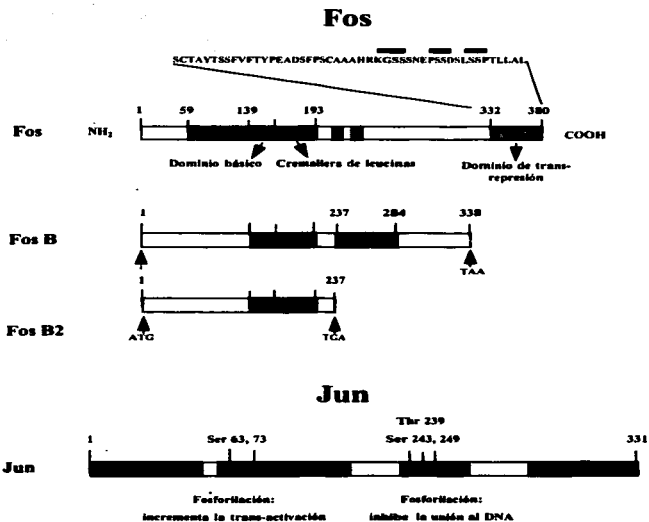
## h) PROTO-ONCOGENE Jun

Los genes de la familia Jun codifican proteínas que conforman el factor de transcripción AP-1 (90 y 91). Estos factores se unen a las mismas secuencias consenso que los factores de transcripción PEA1 de ratón y GCN4 de las levaduras.



**Fig.12. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNAS Fos, FBJ-MuSV Y FBR-MuSV.** La caja negra de FBJ-MuSV representa una región de 49 residuos de aminoácidos distintos a Fos. Las cajas con rayas de Fos unidas con líneas puntuadas indican las regiones deletadas en FBR-MuSV. La proteína FBR-MuSV tiene los 4 exones de Fos, pero con una deleción del cuarto exón y, además, una región gag de 310 aminoácidos en el amino terminal en el lugar correspondiente a 24 aminoácidos de Fos; en el carboxilo terminal tiene dos deleciones, de 13 y 9 aminoácidos respectivamente, dentro del marco de lectura, de tal manera que se reemplazan 98 aminoácidos de Fos con 8 residuos que codifican la caja fox de la proteína FBR-MuSV. Esquema tomado de la referencia 90.





**Fig.1E. COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Fos, FosB, FosB2 Y Jun. SITIOS DE FOSFORILACIÓN DE Fos Y DE Jun CRÍTICOS EN SU FUNCIÓN.** FosB tiene truncado el carboxilo terminal con respecto a Fos, pero retiene los dominios de cremallera de leucina y de unión al DNA. La edición alternativa de FosB genera a FosB2 al remover 140 pb (nucleótidos 1913 a 2052 de FosB) lo que ocasiona un cambio en el marco de lectura a -1 y se origina un codón de término TGA después de la cremallera de leucinas. La secuencia de FosB2 es idéntica a FosB en los primeros 237 aminoácidos. En Fos, las barras arriba de la secuencia del carboxilo terminal indican los tres grupos de serinas (Ser 362-364, Ser368, 369, 371 y Ser373 y 374). El amino terminal de Fos es fosforilado por la PKC, p34<sup>cdc2</sup> y una cinasa nuclear, y el carboxilo terminal es fosforilado por la PKA y por p34<sup>cdc2</sup>. Jun es fosforilado en 5 sitios por la cinasa de la sintetasa del glucógeno antes del sitio de unión al DNA (residuos 227 a 252). Esquema tomado de la referencia 32.

*jun*, al igual que los genes de la familia *Fos* son, genes de inducción temprana, su expresión se induce rápidamente bajo múltiples estímulos extracelulares (Tabla III y Fig. 10), aunque la expresión de *jund* es constitutiva en muchas células (90).

Los miembros que conforman esta familia de genes son: *c-jun*, *junb* y *jund*. Entre *c-jun* y *jund* de humano existe una identidad del 44 % y entre *junb* y *jund* del 45 % (90).

#### **h) PROMOTOR DE *jun***

El promotor de *jun* es más simple, comparado con el promotor de *fos* (90) (Fig 9). *jun* tiene la secuencia AP-1 o TRE en la posición que va de -63 a -72 pb, pero difiere de las secuencias AP-1 de otros genes porque tiene 1 pb más, lo que hace a esta secuencia más afín para unir al heterodímero Jun-ATF2, con respecto a otros sitios AP-1. Esta secuencia hace posible que el proto-oncogene autorregule su transcripción positivamente por lo que la expresión permanente de *c-jun* puede ser una consecuencia de ello. Otras secuencias del promotor de *jun* son el sitio NF-JUN (NF-JUN del inglés: Nuclear factor-JUN) que va de -131 a -141 pb, sitio activado por el TPA o por TNF $\alpha$  (el factor NF-JUN tienen subunidades similares al factor NF $\kappa$ B); la secuencia Sp-1 de -107 a -117 pb; CTF de -86 a -92 pb y RSRF (RSRF del inglés: relate serum response factor) que va de -50 a -59 pb.

La actividad transcripcional del promotor de *jun* es reprimida por el factor CREB (CREB del inglés: CRE proteins binding) probablemente porque parte de la secuencia AP-1 es parecida a la secuencia CRE a la que se une CREB. Sin embargo, dependiendo del estado de fosforilación CREB también puede ser un activador de *jun* (94).

El papel transformante de *jun* se debe a que el producto de este proto-oncogene, la proteína Jun tiene la capacidad por sí misma de unirse a los sitios AP-1, formar el complejo AP-1-Jun y autorregular positivamente su propia transcripción (90). La sola expresión de *jun* es suficiente para que se desarrolle un tumor. Se ha observado que los virus que contienen *v-jun* o un recombinante formado por *v-jun* y *c-jun*, induce la aparición de tumores en las alas de los pollos cuando se inyectan los virus al tejido (90).

#### **D) PROTEÍNA Jun**

La proteína nuclear Jun es oncogénica (92), constituye al factor de transcripción AP-1, ya sea como homodímeros de Jun con *c-Jun*, JunD o JunB, o como heterodímeros con Fos, Fra1 y Fra2. Fos amplifica la unión de Jun al DNA en el siguiente orden: Fos B > Fra1 > Fos (93).

Los complejos Jun-AP-1 son fosforilados en cinco sitios de serina y treonina, dos de los cuales son fosforilados por la PKC, lo que ocasiona una disminución en la capacidad de unión al sitio AP-1; los otros tres sitios son fosforilados por la glucógeno sintetasa-3-

cinasa (90). La serina 243 es muy importante en la regulación de la actividad de Jun, se ha demostrado que si esta se muta se bloquea la fosforilación de otros tres sitios y se incrementa la transactivación de Jun hasta 10 veces; además este residuo no está en v-Jun y esto ocasiona que el factor al unirse al sitio AP-1 active permanentemente la transcripción de *jun* (90). Ver en la Fig.14, la comparación de las regiones de Fos y Jun.

Cada uno de los miembros que forman el factor de transcripción AP-1, es decir, Fos y Jun tienen características particulares tanto, a nivel de gene como a nivel de proteína. AP-1 como tal, tiene características propias que describiré a continuación.

#### **J) FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1**

AP-1 se considera un mensajero nuclear que regula las acciones generadas por las vías de transducción que se encienden en respuesta a factores de crecimiento, hormonas, citocinas y neurotransmisores (93).

Las proteínas de las familias *Fos* y *Jun* forman el factor de transcripción AP-1, un complejo proteico de 39 a 47 kDa, que se forma en el citoplasma de la célula a diferentes tiempos después de la presencia de variados estímulos, dependiendo de la cinética de activación de los genes correspondientes *fos* y *jun* (90 y 95).

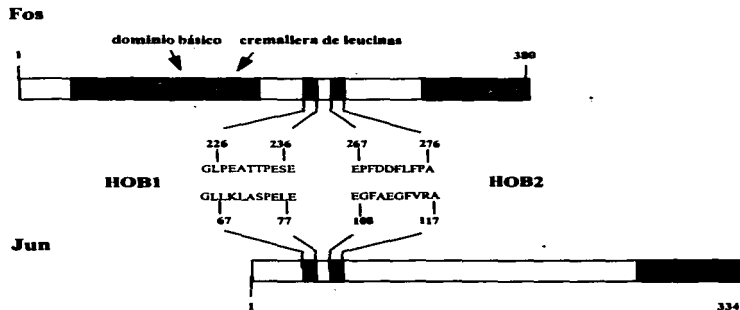
Fos junto con Jun preexistente se transloca al núcleo, de manera que se forman homo- o heterodímeros por medio de los dominios con cremalleras de leucinas requeridos también para la unión al DNA con distintas actividades de unión al DNA. Los dímeros son más estables que las proteínas Jun solas (93 y 95).

Los miembros de AP-1 tienen la capacidad de formar complejos con otros factores (90 y 93), c-Jun se une a los factores ATF2 y ATF3, dímeros que se unen preferencialmente al sitio CRE. Fos y Fra1 forman dímeros con ATF4 (ATF del inglés: activating transcription factor), de tal forma que en algunos casos Fos y Jun contribuyen a la actividad de AP-1 y en otros casos, a la actividad de los factores CREB.

La formación de dímeros de Fos y Jun con otros factores, tales como ATF o CREB permite contar con un número mayor de factores de transcripción que regulan diferencialmente la expresión de los genes blanco que responden al factor AP-1 (93).

#### **k) REGULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1**

La regulación del factor de transcripción AP-1, se da principalmente, a nivel transcripcional y a nivel post-traduccional (93).



**Fig.14. COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Fos Y Jun.** Las cajas homólogas HOB1 y HOB2 se encuentran en el dominio de *trans*-activación de Fos y estas se conservan en el dominio de activación A1 de Jun. La secuencia de Fos de rata es idéntica a la secuencia de Fos de humano, excepto en que la alanina y treonina de las posiciones 230 y 231 son sustituidas por valina y alanina. El dominio HOB1 contiene los sitios de fosforilación por la MAPK. El dominio básico (KCR) (aminoácidos 153 a 155) se conserva en Fos y en Jun. Esquema tomado de la referencia 90.

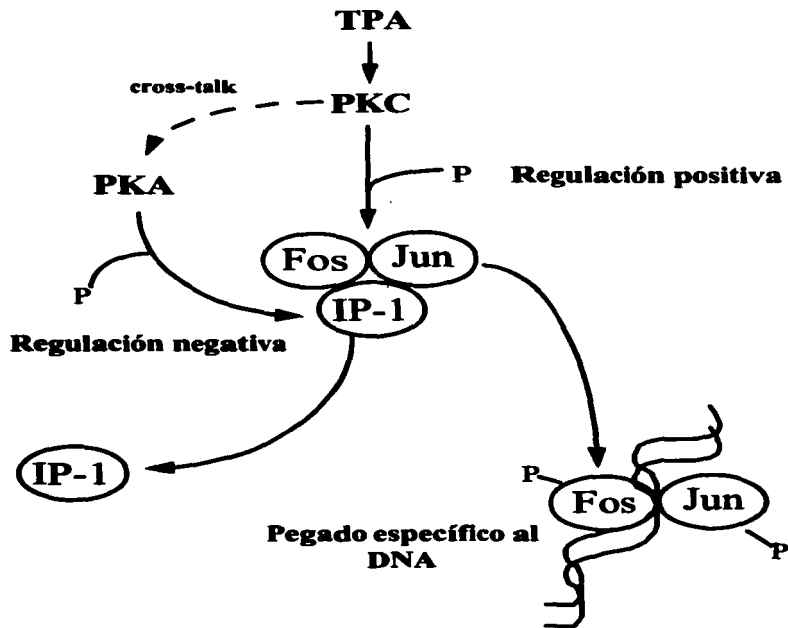
\* **Nivel transcripcional.** La expresión de *fos*, la cual es muy baja en la mayoría de las células no-estimuladas es inducida por un gran número de señales extracelulares (Tabla III). La inducción de la expresión de *fra* y *jun* por ejemplo es más lenta comparada con la de *fos*, pero la de *jun* es continua. *fos* y *jun* tienen varias secuencias reguladoras (Fig.9), muchas de las señales estimulan la transcripción de *fos* por medio de la secuencia SRE que es reconocida por los factores p67<sup>SRE</sup> y p62<sup>TCF</sup>. No es claro si la expresión de estas proteínas es constitutiva o si esta regulada por señales extracelulares (93). En cuanto a la expresión de *jun* esta es inducida por varios estímulos extracelulares (Tabla III), la expresión persistente de *jun* probablemente se deba a la capacidad que tiene Jun de autorregular su expresión al unirse al sitio AP-1 del promotor del propio gene (93), la proteína Jun preexistente se encuentra en niveles elevados y al parecer es la responsable de la actividad basal de AP-1 (93).

\* **Nivel post-traduccional.** La actividad de AP-1 es regulada por fosforilación, tanto de la proteína preexistente como de aquella sintetizada *de novo*. Las cinasas JNK, FKR y MAPK son las más importantes en dicha regulación (90, 93 y 96) (Fig.10). Fos es fosforilado en la treonina 232 por una cinasa específica, la FRK (FRK del inglés: Fos response kinase), fosforilación que potencia la transcripción del gene (90). El complejo TCF/Elk-1 (Elk-1 es miembro de la familia de los factores TCF) que induce la síntesis de c-Fos al unirse al promotor del gene es fosforilado por la MAPK, este permite que se forme el complejo ternario SRE-TCF-Elk-1 que también promueve la transcripción del gene (90). *In vitro*, se ha observado la fosforilación de Fos por la PKC y por la p34<sup>cdc2</sup> (90). La MAPK fosforila un sitio inhibidor del carboxilo terminal de Fos (96).

Por su parte, Jun es fosforilado en cinco sitios de serina y/o treonina rodeados por prolinas, tres de ellos por la glucógeno sintetasa 3-cinasa justo antes del sitio de unión al DNA; La fosforilación de las serinas 63 y 73 en el dominio de transactivación por la JNK (JNK del inglés: Jun N-terminal kinase) potencia la transcripción de *jun*. Dichas cinasas reconocen sitios de los factores TCF/Elk y ATF2 (96). La fosforilación de c-Jun y ATF2 estimula su capacidad de activar la transcripción de *c-jun*, de manera que AP-1 incrementa su actividad en respuesta a estímulos de la JNK (UV, radiación, TNF $\alpha$ ) (96).

Otras formas de regulación de AP-1, implícitas en la función de Jun y Fos son (90):

- 1) La estabilidad de los heterodímeros: Fos-Fos < Jun-Jun < Fos-Jun.
- 2) La presencia de Jun, ya que al interactuar cooperativamente con Fos inhibe la transcripción de *fos*.
- 3) La expresión diferencial de Fos y Jun, ya que están presentes sólo en determinados estados del desarrollo y sólo en determinados tejidos.
- 4) La expresión de los genes correspondientes *fos* y *jun*, la cual es temporalmente distinta.
- 5) La proteína inhibidora de la actividad de AP-1 llamada IP-1 (IP-1 del inglés: inhibitor protein 1) de 30 a 40 kDa. Esta proteína en su forma fosforilada por la PKA, bloquea la unión del dímero Fos-Jun al DNA (97) (Fig.15).



**Fig.15. REGULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1.** La fosforilación de Fos y de Jun por la proteína cinasa C (PKC) permite la formación del factor de transcripción AP-1 que se une al DNA de genes que tienen la secuencia AP-1 o TRE. La proteína inhibidora del factor AP-1, llamada IP-1, en su forma activa o desfosforilada previene la unión al DNA. La forma inactiva o fosforilada de IP-1, por la PKA, al no unirse al dímero Fos-Jun permite que AP-1 se una específicamente al DNA. Esquema tomado de la referencia '97.

El papel exacto de los cambios dinámicos en la composición y en la actividad de AP-1 no se conocen con precisión, Jun B puede reprimir la activación de *c-jun* actuando entonces como modulador negativo. De manera general, AP-1 participa en muchos fenómenos celulares ya que una gran diversidad de genes que codifican proteínas del metabolismo, proliferación, diferenciación, muerte celular, etcétera, tienen la secuencia reguladora AP-1 (Tabla IV).

<b>GENE</b>	<b>SITIO AP-1</b>	<b>PROTEÍNA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>Referencias</b>
<i>Jun</i>	promotor	Jun (39 kDa)	Proliferación Diferenciación Muerte celular	89,90,92, 96,98, 99, 100 101 y 102 103
<i>Fos</i>	promotor	Fos (55 kDa)	Proliferación Diferenciación Muerte celular	89,90,92, 96,98, 99,100 101 103
<i>tirosina hidroxilasa</i>	promotor	Tirosina hidroxilasa	Cataliza la conversión de L-tirosina a L-Dopa, paso limitante de la biosíntesis de las catecolaminas	104
<i>mapk</i>	promotor	MAPK (44 kDa)	Participa en cascadas que promueve proliferación celular	105
<i>odc</i>	no determinado	Omiina Descarboxilasa	Metabolismo de poliaminas Síntesis de DNA	106
<i>CD11c</i>	promotor	Integrina $\beta 2$	Receptores de adhesión de leucocitos	102
<i>Metalotransferrina</i>	promotor	Metalotransferrina	Proteína transportadora de hierro	107
<i>colagenasa IV</i>	promotor y exón 1	Colagenasa (92 kDa)	IV Destrucción de matriz extracelular	108
<i>colágenas</i>	promotor	Colágena I, II, III y IV	Remodelación de cartilago y hueso Mantenimiento estructural de los tejidos	99
<i>metaloionina IIA</i>	promotor	Metalotionina IIA	Estrés oxidativo	96 y 99
<i>estromelina 1 y 2</i>	no determinado	Estromelina 1 y 2	Proteínas de glicoproteínas y proteoglicanos de la matriz extracelular	99
<i>polimerasa <math>\alpha</math></i>	promotor	Polimerasa $\alpha$ del DNA	Síntesis de DNA	98
<i>Histona</i>	promotor	Histona	Proliferación celular	109

Tabla IV. El factor de transcripción AP-1 regula la expresión de genes que codifican proteínas que son importantes en el metabolismo, la diferenciación y la proliferación celular.

## XI. VÍAS DE TRANSDUCCIÓN QUE INDUCEN LA EXPRESIÓN DE LOS PROTO-ONCOGENES *fos* y *jun*

Por estudios realizados en distintos sistemas celulares se sabe que en la expresión de los proto-oncogenes *fos* y *jun* es regulada por la activación de distintos tipos de receptores membranales, receptores de factores de crecimiento, de citocinas y de ligandos que se unen a receptores acoplados a proteínas G (89, 90, 91, 95, 94 y 96) que encienden la maquinaria de diversas vías de transducción de la señal.

Para inducir la expresión de *fos* y *jun* distintas señales extracelulares convergen en la activación de la proteína Ras (96). A partir de Ras la señal se bifurca río abajo en dos cascadas de amplificación, una de las cuales termina en la expresión de *fos* y otra en la expresión de *jun* (Fig.16).

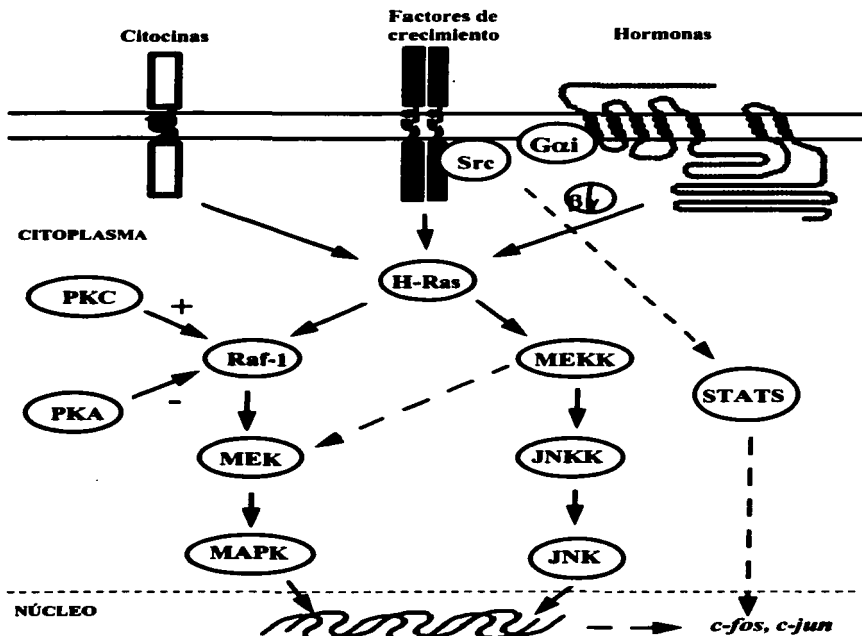
Los receptores de citocinas, al ser activados por su ligando, interactúan con una serie de cinasas de residuos de tirosina conocidas como Lck, Fyn, Lyn, Yes, etc y posteriormente activan a Ras para amplificar la señal. Los mecanismos moleculares posteriores a la activación de Ras en respuesta a las citocinas y que terminan en la expresión de *fos* y *jun* no se conocen (96) (Fig.16).

Por otro lado, los receptores de factores de crecimiento activan la vía clásica de proliferación en donde participan de manera importante la MAPK, enzima que por fosforilación regula la actividad de enzimas intracelulares y de factores de transcripción que participan en la proliferación celular, y Ras, una proteína oncogénica (96). En lo que se refiere a la vía de transducción que induce la expresión de *fos*, participan dos MAPK, una de ellas contribuye a la actividad de AP-1 al fosforilar al complejo TCF/Elk-1 que se une al promotor del gene e induce su transcripción, y otra, la FRK fosforila a Fos y a Jun en sitios que promueven un aumento en la transcripción de ambos genes (96).

Recientemente, se ha descrito que una vía alterna a Ras induce la expresión de *fos*, aquella en la que participan v-Src y los factores de transcripción STATS. v-Src es una proteína que induce mitogénesis y transformación de las células por múltiples efectos sobre las diversas vías de señalización, dependiendo del contexto celular en el que se exprese Src. Src estimula la activación de la MAPK e induce la expresión de *fos* en células quiescentes por privación del suero (110). El mecanismo molecular consiste en que Src, o induce la formación del complejo ternario que por medio de SRE induce la transcripción del proto-oncogene (111) o activa a los factores STAT que se unen a la secuencia SIE en el promotor de *fos* (110), es interesante que en este mecanismo al parecer no intervengan de manera significativa las cinasas JAKS (JAKS del inglés: Just another kinases) que activan por fosforilación a los STATS, por lo que se sugiere que el dominio de cinasa del receptor de EGF es crucial en la señalización (111).

La expresión de *jun* también se induce por factores de crecimiento que provocan la activación de Ras, sólo que en este caso los elementos que participan río abajo en la vía de transducción son las cinasas MEKK (cinasa de la MEK), la JNKK (cinasa de la cinasa





**Fig.16. VÍAS DE TRANSDUCCIÓN QUE INDUCEN LA EXPRESIÓN DE LOS PROTO-ONCOGENES *fos* Y *jun* OBTENIDAS DE DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.** La transcripción de *fos* es estimulada por la vía clásica de los receptores para factores de crecimiento en la que participa la MAPK. La transcripción de *jun* es estimulada por medio de una vía de transducción en la que participan las cinasas: MEKK (cinasa de MEK), JNKK (cinasa de la cinasa de Jun) y JNK (cinasa específica de Jun). Las subunidades  $\beta$  de las proteínas G12 inducen la expresión de *c-fos* (115); así mismo, los factores de transcripción STAT participan en la expresión de *c-fos* (110 y 111). Las cinasas PKC y PKA regulan la expresión de estos proto-oncogenes al fosforilar blancos específicos de la vía de la MAPK (89 y 90).

de Jun) y la JNK, esta última fosforila al factor ATF2 y a c-Jun por lo que promueve la síntesis del mensajero de *jun* (96) (Figs. 11 y 16).

Por otro lado, la activación de receptores acoplados a proteínas G induce la expresión de *fos* y *jun* (Fig.16), probablemente por medio de distintas vías dado que estos receptores membranales se acoplan a distintos efectores. Al menos, uno de los caminos propuestos en la expresión de *fos* por este tipo de receptores implica la activación de Ras por el complejo  $\beta\gamma$  (112 y 113) (Fig.16) en donde el mecanismo, probablemente sea aquel en donde  $\beta\gamma$ , proveniente de proteínas G activadas-sensibles a la toxina pertussis, reclutan a Src a la membrana plasmática que junto con Shc reclutan a su vez, a la forma activa de Ras (23). Otro mecanismo depende de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas Gi acopladas a los receptores del ácido lisofosfatídico y a la FLC  $\beta$  (114), y/o en particular a la generación de los segundos mensajeros  $IP_3$  y DAG (115).

El mecanismo que induce la transcripción de *fos* y/o *jun* por medio de receptores acoplados a proteínas G, de la familia Gq o Gs, no se conoce. Sin embargo, cinasas como la PKC o la PKA que forman parte de las vías de amplificación de dichos receptores regulan por fosforilación a la proteína Raf-1, componente de la vía de la MAPK que activada por diversos estímulos extracelulares estimula la síntesis de estos proto-oncogenes (89 y 90).

Dada la importancia que lleva consigo la activación de los receptores adrenérgicos y su posible papel en el control de la expresión de genes de inducción temprana, como los proto-oncogenes *fos* y *jun*, durante el desarrollo de esta tesis se plantearon los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar la posible modulación adrenérgica de la expresión de proto-oncogenes.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Explorar en hepatocitos de cuyo si hormonas como la angiotensina II, la histamina, la vasopresina, la norepinefrina y otros agentes que activan al sistema de la AC y al sistema de recambio de FI-Calcio como los ésteres de forbol en el último caso, inducen la expresión del proto-oncogene *c-fos*. Caracterizar la expresión de *c-fos* inducida por la activación de receptores  $\beta$ - y  $\alpha_1$ -adrenérgicos.
- Determinar si la expresión de los proto-oncogenes *fos* y *jun* es específica de la activación de los distintos subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en células Rat-1, que sobreexpresan de manera independiente a los tres subtipos.
- Determinar el posible papel de la PKC en la transcripción de *c-fos* y *c-jun* en respuesta a la activación de los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

Cuyos machos de 220 a 250 gramos de peso *ad libitum*. Fibroblastos de pulmón embrionario de rata de la línea celular Rat-1 transfectados con los cDNAs para los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (el receptor  $\alpha_{1a}$  fue clonado de cerebro de bovino, el  $\alpha_{1b}$  fue clonado de células de músculo liso de hámster de la línea celular DDT1-MSF2 y el receptor  $\alpha_{1c}$  fue clonado de cerebro de bovino). Las tres líneas celulares nos fueron donadas por los Drs. L. Allen, Marc Caron y Robert Lefkowitz de la Universidad de Duke en Durham Carolina del Norte, U. S. A.

La Colagenasa tipo IV fue de Worthington. La norepinefrina, isoproterenol, propranolol, PMA (phorbol-myristate-acetate), la estaurosporina, prazosina, endotelina-1, tiocianato de guanidina, formamida, ambrerlita, dextrán sulfato de sodio, ortofosfato de sodio, DNA de esperma de salmón, ficoll, albúmina de suero de bovino (fracción V), poliactilamida, bis-acrilamida fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La metoxamina nos fue donada por Burroughs Wellcome. El 5-metil-urapidil y el Calfostin C fueron de Research Biochemicals INC. El Tri-Reagent™ fue de Molecular Research Center, INC. El isopropanol, etanol, cloroformo, alcohol isopropílico, formaldehído, citrato de sodio, cloruro de sodio fueron de Baker. El material de cultivo de células y medios de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) y Hanks, tripsina, antibióticos, G418 (análogo de la neomicina) y los anticuerpos policlonales anti-PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  fueron de GIBCO BRL (Gaithersburg, MD). El plásmido que contiene la sonda de *c-fos* humano, el kit de Nick Translation para el marcaje de sondas de DNA, el  $^{32}$ P- $\alpha$ -dCTP (6000 Ci/mmol), el kit para la detección de proteínas por quimioluminiscencia ECL™, la membrana de nylon, el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo y el conjugado de estreptavidina acoplado a peroxidasa fueron de Amersham (Buckinghamshire, U. K.). La membrana de nitrocelulosa y la agarosa fueron de Bio Rad. La sonda de *c-Jun* de ratón (plásmido 63026, clona JAC.1) se obtuvo de American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las enzimas de restricción fueron de New England Biolab (Beverly, MA). Las placas de autorradiografía X-Omat, el fijador y revelador GBX fueron de Kodak.

### MÉTODOS

#### 1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE HIGADO DE CUYO.

Las células de hígado de cuyo se obtuvieron frescas para cada experimento de animales con un peso de 220 a 250 grs de peso por el método de Berry y Friend (116). El hígado se perfunde con la solución Krebs-Ringer (NaCl 120 mM,  $K_2PO_4$  1.2 mM,  $MgSO_4$  1.2 mM,  $NaHCO_3$  10 mM, pH 7.4) y gaseo continuo de  $O_2$  95 % y  $CO_2$  5 % a 37 °C. La perfusión del hígado con  $CaCl_2$  1.3 mM y colagenasa 1mg/ml en Krebs-Ringer a 37 °C permite la

digestión del órgano y el aislamiento de las células hepáticas. La viabilidad de las células se determinó por exclusión con azul de tripán al 0.1 %.

## 2. CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATA DE LA LÍNEA CELULAR Rat-1.

Las tres líneas celulares Rat-1 transfectadas de manera estable con los genes de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se mantuvieron en cultivo bajo una atmósfera de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  en cajas de 6 pozos en el medio DMEM con glucosa y glutamina suplementado con suero de bovino al 10 %, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycina, 100 unidades/ml de penicilina, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina y 300  $\mu\text{g/ml}$  del antibiótico G418 que sirvió para la selección de las células transfectadas con los receptores  $\alpha_1$  (70). Los experimentos se iniciaron con los cultivos confluentes como medida de homogeneidad entre las tres líneas celulares. La resiembra de las células se realizó periódicamente durante dos meses, tiempo después del cual se descongelaron células y se reiniciaron los cultivos.

## 3. AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL DE HEPATOCITOS Y DE CÉLULAS Rat-1

La purificación del RNA total se realizó por el método de Chomczynski y Sacchi (117) empleando el reactivo comercial Tri-Reagent<sup>TM</sup> en el caso de los hepatocitos de cuyo, o con la solución que contiene tiocianato de guanidina 4 M, sarcosyl 0.1 %, citrato de sodio 0.75 M, NaAc 2M pH 4,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM y fenol saturado con agua (1:1) en el caso de las células Rat-1 (118 y 119).

50 mg de hepatocitos de cuyo o 10 mg de células Rat-1 incubadas previamente con las hormonas o agentes durante 30 min en la mayoría de los casos, o de 0 a 4 horas en el caso de los cursos temporales.

Las células se lisan con la solución Tri-Reagent o la solución de tiocianato de guanidina 4 M, cada muestra se agita de forma vigorosa por 30 seg y se les agrega 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo-isoamílico (1:50), se mezclan y se dejan en reposo 5 minutos, se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa (RNA) se separa en tubos limpios, se agrega isopropanol y las muestras se almacenan a  $-70^\circ\text{C}$  durante 1 hora, se centrifugan a 12,000 rpm durante 20 minutos. La pastilla recuperada de RNA se lava con etanol al 75 % y después de centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos la pastilla se seca en el SAVANT durante 20 a 30 minutos. El RNA se resuspende en agua estéril tratada con dietilpircarbonato (DPC) y se prepara para gotearlo sobre membranas de nylon (dot blot) o para correrlo en geles de agarosa al 1.5 % con formaldehído al 20 % y MENP (MOPS, EDTA,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y transferirlo posteriormente a membranas de nylon por capilaridad (northern blot).

## 4. PURIFICACION DE LAS SONDAS DE DNA: GAPDH, fos y jun.

a) Obtención de plásmidos (120). Las bacterias *E. coli* de la cepa HB101 con los plásmidos que contienen los fragmentos de los genes para la gliceraldehído-3-fosfato

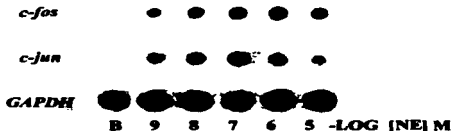
deshidrogenasa (*GAPDH*) y para los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* se crecieron en medio Luria con ampicilina al 2.5 % a 37 °C y agitación constante hasta que los cultivos llegaron a una D.O.<sub>660 nm</sub> de 0.6, el plásmido se amplificó con cloranfenicol 100 mg/ml por 2 horas.

Para recuperar las bacterias, los cultivos se centrifugan a 8,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, estas se lisan en la solución que contiene glucosa 50 mM, EDTA 100 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, lisozima 2 mg/ml y RNA'sa 10 mg/ml. Después de 30 min en hielo se obtienen los protoplastos, se agregan 100 µl de NaOH 0.2 N y SDS al 1 % y se mezclan, luego se añaden 75 µl de NaCH<sub>3</sub>COO' pH 5 y se mezclan. El DNA cromosomal se retira y el resto (DNA) se mantiene en hielo 5 min, se centrifuga a 10,000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se le agrega etanol al 100 % (3 volúmenes), los tubos se guardan a -70 °C por 1 hora y luego se centrifugan a 12,000 rpm durante 20 min. La pastilla de DNA se seca en el SAVANT por 30 minutos. El DNA (plásmido) se analiza por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en donde el DNA se tiñe con bromuro de etidio 0.5 mg/ml y se observa en un transiluminador de UV de longitud de onda corta.

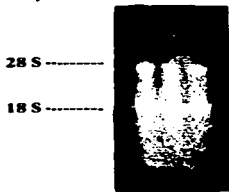
b) **Obtención de sondas** (120). El inserto de la *GAPDH* de 605 pb se obtiene por doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Hind III*; la sonda de *c-fos* de 615 pb se obtiene por digestión del plásmido de 2.2 Kb con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* y la sonda de *c-jun* del plásmido 63026, clona JAC.1 de 2.6 Kb se obtiene por digestión con *EcoRI*. Las digestiones de los plásmidos se checan en geles de agarosa al 1.5 %. Los insertos se obtienen de geles de poliacrilamida al 7.5%-TBE (Tris-HCl, EDTA y ácido bórico) por electroelución a 200 mA durante 2 horas, el DNA que se recupera en TBE 1X, se lava con butanol saturado con NaCl 3 M y se centrifuga. Se recupera la fase acuosa (DNA) y se le agrega etanol al 100 %, se almacena a -20 °C por 1 hora. Los insertos se analizan por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y el DNA se tiñe con bromuro de etidio.

## 5. EXPRESION DE PROTO-ONCOGENES (DOT BLOT Y NORTHERN BLOT)

a) **Dot-blots** (118, 119 y 120). 50 o 100 µg de RNA total (cuantificado a A<sub>260nm/280nm</sub>) se prepara en la solución que contiene formaldehído, SSC 20X (citrato de sodio, acetato de sodio, pH 7.4) y formamida desionizada, se calienta a 65 °C 15 minutos, posteriormente se pasa a hielo 5 min y se gotea sobre membranas de nylon. El RNA queda fijo en la membrana de nylon al entrecruzarlo con UV (cuatro ciclos de 125 Joules/cm<sup>2</sup>).



**b) Northern blot (120).** 50 µg de RNA total por carril se prepara en la misma solución que se utiliza para el dot-blot, se calienta a 65 °C por 15 minutos y se corre en geles de agarosa al 1.5% y formaldehído a 100 mA por 3-4 horas a 4 °C. El RNA se transfiere a membrana de nylon por capilaridad en la solución SSC 20X por 48 horas. El RNA queda fijo en la membrana de nylon al entrecruzarlo con UV (cuatro ciclos de 125 Joules/cm<sup>2</sup>).



## 6. HIBRIDACION

**a) Marcaje de las sondas.** 1 µg de DNA, correspondiente a los insertos de la *GAPDH*, *c-fos* y *c-jun*, se marcó con 10 µCi de <sup>32</sup>Pα dCTP con una actividad específica de 6000 Ci/mmol, por la reacción de Nick Translation que consiste en la síntesis de las hebras complementarias del DNA problema por la DNA polimerasa II de los fragmentos hechos por la DNasa I. Las sondas se marcan radioactivamente con <sup>32</sup>P en los sitios correspondientes al CTP, los otros nucleótidos ATP, GTP y TTP se usan fríos. La reacción de marcaje dura 90 minutos y se realiza a 16 °C, esta termina al precipitar el DNA con 100 µl de acetato de sodio 3M pH 4 y etanol absoluto (3 volúmenes). El DNA marcado correspondiente a los insertos se almacena a -70 °C por 1 hora, se centrifuga 20 min a 12,000 rpm, se seca y se resuspende en 50 µl de agua estéril.

**b) Prehibridación.** Las membranas de nylon con el RNA fijo se hidratan en SSC 10X, se colocan en bolsas de plástico a las que se les agrega la solución de prehibridación (Denhardt 50X, formamida desionizada, SSPE 10X (NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y EDTA, pH 7.4), DNA de esperma de salmón, SDS o Duodecil sulfato de sodio y dextrán sulfato de sodio) por 4 horas a 55 °C.

**c) Hibridación.** Los insertos de DNA, previamente marcados con <sup>32</sup>Pα dCTP, se calientan a 65 °C 15 min, posteriormente se pasan a hielo 5 minutos y finalmente se añaden a los filtros prehibridados. La hibridación se realizó por 12 horas o más a 55 °C.

**d) Lavado de las membranas hibridadas.** Las membranas de nylon se lavan dos veces por 15 minutos cada vez con la solución SSC 0.2X y SDS al 0.1 % a 55 °C; dos veces 15 minutos cada vez con SSC 0.1X y SDS al 0.1 % a 55 °C y tres o cuatro veces 5 min cada vez con la solución SSC 0.1X a temperatura ambiente. Las membranas se dejan secar hasta exponerlas a placas de autorradiografía X-Omat por 8 días o más.

vez con la solución SSC 0.1X a temperatura ambiente. Las membranas se dejan secar hasta exponerlas a placas de autorradiografía X-Omat por 8 días o más.

## 7. INMUNOBLOTS.

**a) Obtención de proteínas.** Los inmunoblots para observar la translocación de la PKC se realizaron con las fracciones citosólica y membranal de las células Rat-1 (121). Los inmunoblots para observar la *down-regulation* de la PKC por pretratamiento durante 18 horas con PMA se realizaron con extractos totales de proteína (121).

Las células se homogenizaron con una jeringa de insulina en la solución de lisis que contiene Tris-HCl 20mM, glucosa 10 mM, EDTA 2mM, EGTA 2mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM, aprotinina 100  $\mu$ g/ml, inhibidor de tripsina 100  $\mu$ g/ml, leupeptina 100  $\mu$ g/ml, PMSF (Fenil.metil.sulfonil fluoruro) 100  $\mu$ g/ml y glucosa 10 mM pH 7.4. El lisado se centrifuga a 13,000 rpm 20 min, la fracción citosólica se recupera en tubos limpios y la fracción membranal se lava en la misma solución, posteriormente se homogeniza en la misma solución que además contiene tritón X-100 al 1 %, se deja en hielo 30 min, se centrifuga a 13,000 por 20 min para recuperar la fracción membranal soluble en detergente.

Para obtener los extractos de proteína total, las células se homogenizan en la solución que contiene tritón X-100 1 %, se deja en hielo 30 min y se centrifuga a 13,000 rpm por 20 min.

**b) Determinación de proteínas.** La cantidad de proteína se determinó por el método colorimétrico de Lowry (122).

**c) Electroforesis (121).** 50  $\mu$ g de proteína por carril (citósol, membrana o extracto total) se corren en geles de poliacrilamida:bis-acrilamida (30:0.8) al 10 % a 50 mA por gel en la cámara de electroforesis de Hoefer.

**d) Transferencia de proteínas (120).** Las proteínas en los geles de poliacrilamida se transfieren a membranas de nitrocelulosa en la solución que contiene Tris-HCl 20 mM, metanol al 20 % y SDS 0.1 % pH 8.3 a 50 mA por gel durante 2 horas en la cámara de transferencia semi-seca de Hoefer.

**e) Bloqueo de las membranas.** Las membranas de nitrocelulosa se bloquean para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos en PBS (NaCl, NaHPO<sub>4</sub> y KHPO<sub>4</sub>, pH 7.4), Tween-20 0.1 % y leche en polvo descremada al 5 % por 1 hora a 37 °C.

**f) Incubación con los anticuerpos.** Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas se ponen en contacto con los anticuerpos primarios anti-PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ , respectivamente, por 2 horas a 37 °C y agitación constante (los anticuerpos 1:1000 se preparan en PBS, Tween-20 al 0.1 % y leche al 1 %); las membranas se lavan con PBS-Tween-20 al 0.1 % por 60 min; se incuban con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa 1:1000 por 1 hora a 37 °C.



**g) Revelado por quimioluminiscencia.** La detección de PKC  $\alpha$  de 80 kDa, PKC  $\delta$  de 76 kDa, PKC  $\epsilon$  de 95 kDa y PKC  $\zeta$  de 70 kDa, isoformas presentes en las células Rat-1 (123) se realizó por quimioluminiscencia. El luminol emite luz cuando este reacciona con la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario. Al exponer las membranas a placas de autorradiografía por un tiempo determinado, la luz emitida queda impresa.

#### **8. DENSITOMETRÍA.**

La densitometría de los dot-blots e inmunooblots se obtuvo a una D.O.<sub>560 nm</sub> con el programa Gel Scan Protein en el espectrofotómetro Beckman 650 DU. El análisis de los resultados obtenidos se hizo con los valores de la integral del área bajo la curva de cada punto (dot blot) o banda (inmunoblot). Los valores de cada gráfica o tabla de resultados se presenta como el porcentaje del efecto producido por el estímulo, con respecto al valor del basal de cada experimento. Los resultados son el promedio +/- el error estándar de 5 a 10 experimentos independientes.

Los valores obtenidos de los experimentos de translocación corresponden al porcentaje de incremento de la cantidad de PKC en membrana de las células estimuladas, con respecto al valor de la cantidad de PKC basal, obtenido de las células no-estimuladas. En los experimentos de *down-regulation* los valores corresponden al porcentaje de disminución de la señal de la PKC de células que fueron pretratadas con PMA, con respecto al valor de la señal de la PKC de células no-tratadas. Los resultados son el promedio +/- el error estándar de 4 a 6 experimentos realizados de manera independiente.

## RESULTADOS

Los resultados del trabajo experimental de esta tesis se muestran en dos manuscritos.

### RESUMEN DE RESULTADOS:

1) J. Adolfo García Sáinz y Rocío Alcántara Hernández (1996).  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptor activation increases *c-fos* expression in isolated guinea pig hepatocytes. *Pharmacology Communications*; 7:107-113.

En hepatocitos aislados de cuyo, la norepinefrina (en presencia de 10  $\mu$ M de propranolol) (Fig.1) y la metoxamina (agonista específico del subtipo  $\alpha_1c$ -adrenérgico) (Fig.2) incrementan los niveles de expresión del proto-oncogene *c-fos*, de manera dependiente de la concentración del agonista. Este efecto fue bloqueado por 1  $\mu$ M de prazosina y por 10  $\mu$ M de 5 metil-urapidil, antagonistas selectivos de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Tabla I). Así mismo, el isoproterenol (agonista específico de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos) incrementa la expresión de *c-fos* de forma dependiente de la concentración (Fig.3), este efecto fue bloqueado por 10  $\mu$ M de propranolol, un antagonista específico de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Tabla I).

Estos resultados indican que las aminas adrenérgicas, tanto aquellas que activan receptores  $\alpha_1$ - como receptores  $\beta$ -adrenérgicos son capaces de inducir la expresión del proto-oncogene *c-fos*.

2) J. Adolfo García-Sáinz, Rocío Alcántara Hernández y José Vázquez Prado (1997). Activation of  $\alpha_1$ -adrenoreceptors subtypes induce proto-oncogene expression. Role of protein kinase C (Trabajo sometido a revisión).

En fibroblastos de pulmón embrionario de rata de la línea celular Rat-1, transfectados de manera estable con los cDNAs de los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se observa que 10  $\mu$ M de norepinefrina (más 10  $\mu$ M de propranolol) induce la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*, al activar a los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$ . La expresión de los dos proto-oncogenes es rápida y transitoria, se observa un desde los 5 y hasta los 30 minutos de exposición al agonista (Fig.1), sin embargo, la expresión de *c-jun* si bien es rápida, también es más prolongada, si la comparamos con la expresión de *c-fos*, ya que después de 1 hora de estimulación con norepinefrina el nivel del RNAm de *c-jun* todavía se mantiene notablemente elevado, mientras que la expresión de *c-fos* cae poco después de los 30 min (Fig.1).

El efecto de la norepinefrina para inducir la expresión de *c-fos* (Fig.2) y la expresión de *c-jun*, medida a los 30 minutos (Fig.3) es dosis-dependiente para los tres subtipos, y el efecto se bloquea por 1  $\mu$ M de prazosina, sin embargo, aunque los tres subtipos  $\alpha_1$  inducen la expresión de *c-fos* y *c-jun* presentan cada uno, un orden de eficacia particular para inducir la expresión de los proto-oncogenes. Así, el orden de eficacia que

observamos para inducir la expresión de *c-fos* es:  $\alpha_{1d} > \alpha_{1b} = \alpha_{1a}$ , y para la expresión de *c-jun* es:  $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} > \alpha_{1d}$ .

Los valores de las EC<sub>50</sub> (dosis a la que se obtiene la mitad del efecto máximo) es de 5 nM para inducir la expresión de *c-fos* y de 300 nM para inducir la expresión de *c-jun* en células transfectadas con los receptores  $\alpha_{1a}$ ; de 30 nM para *c-fos* y 300 nM para *c-jun* en células transfectadas con los receptores  $\alpha_{1b}$  y de 300 nM, tanto para *c-fos* como para *c-jun* en células transfectadas con el receptor del subtipo  $\alpha_{1d}$ .

Por otra parte, la expresión de *c-fos* y *c-jun* en estas células se incrementa en respuesta al PMA. 1  $\mu$ M de PMA es suficiente para estimular 2 veces sobre el basal, tanto la síntesis del mensajero de *c-fos* como de *c-jun*, este efecto del PMA se observa en las líneas celulares (Fig.4). El efecto del PMA sobre la expresión de *c-fos* y *c-jun* es abatido por el pretratamiento de las células durante 18 horas con 1  $\mu$ M de PMA (Fig.4) y por el tratamiento de las células durante 30 minutos con inhibidores específicos de la PKC, como la estaurosporina (Fig.4) y el Calfosfín C (datos no mostrados). Igualmente el efecto de la norepinefrina sobre la inducción de la expresión de *c-fos* y *c-jun* es bloqueado por el pretratamiento prolongado de las células con PMA (Figs.2 y 3), lo que sugiere que participa la PKC en la vía de transducción de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos que lleva a la expresión de estos genes de inducción temprana.

Estos resultados se confirman por inmunoblot en donde se observa que el pretratamiento prolongado de las células con el PMA provoca la *down regulation* de la PKC. Existe una disminución clara de las tres isoformas de la PKC sensibles a los ésteres de forbol presentes en las células Rat-1. La exposición de las células a PMA por 18 horas provoca una disminución del 80 % en la detección inmunológica de la PKC  $\alpha$ , del 75 % de la PKC  $\delta$  y del 66 % de la PKC  $\epsilon$ , mientras que de la isoforma PKC  $\zeta$  insensible a ésteres de forbol no se detectó ningún cambio (Fig.6). La activación de las isoformas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , observada como la translocación de la cinasa a la membrana plasmática, ocurre rápidamente, a los 5 minutos de exposición, tanto, al agonista como al PMA, éstas ya se detectan en la membrana plasmática. La norepinefrina y el PMA no tienen ningún efecto sobre la translocación de la PKC  $\zeta$  (Fig.7, anexa a los resultados del manuscrito).

La participación de la PKC sobre la expresión de *c-fos* y *c-jun* en respuesta a la activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos es específica. En células Rat-1, la endotelina-1 (Et-1) una hormona peptídica de 22 aminoácidos que se une a receptores acoplados al sistema de recambio de  $\text{Ca}^{2+}$ , al igual que los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, incrementa los niveles de expresión de *c-fos* y *c-jun*, pero de forma independiente de la PKC (Fig.5), al parecer ésta es importante pero en eventos a largo plazo. Se ha visto que la *down regulation* de la PKC afecta la síntesis de DNA inducida por Et-1 (65). Nosotros, observamos que el pre-tratamiento prolongado de las células con 1  $\mu$ M de PMA no abate totalmente la expresión de *c-fos* y *c-jun* en respuesta a Et-1 (Fig.5), así mismo, la estaurosporina no tiene un efecto claro sobre la respuesta que produce la Et-1 en la expresión de los dos proto-oncogenes, a diferencia de las respuestas observadas con norepinefrina (Fig.5).

## $\alpha_1$ - AND $\beta$ -ADRENOCEPTOR ACTIVATION INCREASES *c-fos* EXPRESSION IN ISOLATED GUINEA PIG HEPATOCYTES

J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ and ROCÍO ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ

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

Norepinephrine (in the presence of propranolol) and methosamine increased in dose-dependent fashions the expression of *c-fos*. This effect was blocked by prazosin or 5-methyl-urapidil suggesting the involvement of  $\alpha_1$ -adrenoceptors. Isoproterenol was also able to induce the expression of this proto-oncogene and its action was blocked by propranolol indicating that  $\beta$ -adrenoceptors can also mediate this effect.

Our results indicate that adrenergic amines increase the expression of the proto-oncogene *c-fos* via stimulation of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptors.

**KEY WORDS:**  $\alpha_1$ -adrenoceptors,  $\beta$ -adrenoceptors, *c-fos*, hepatocytes

### INTRODUCTION

Current concepts indicate that hormones and neurotransmitters that exert actions in very short periods of times are also able to induce longer-term responses, such as promoting the expression of specific genes (Curran and Morgan, 1987; Ransone and Verma, 1990). Among the genes that are rapidly expressed in response to hormones, neurotransmitters and growth factors are *c-fos* and *c-jun* whose products, Fos and Jun, together constitute the AP1 transcription factor (Curran and Morgan, 1987; Ransone and Verma, 1990). Such transcription factors have been regarded as nuclear third messengers that couple short-term stimulations to long-term alterations in cellular phenotype by regulating the expression of target genes (Curran and Morgan, 1987; Ransone and Verma, 1990).

It has been observed in isolated rat hepatocytes that activation of  $AT_1$  angiotensin receptors induce *c-fos* expression (4); phorbol myristate acetate (PMA) also markedly induce the expression of this proto-oncogene (González-Espinosa and García-Sáinz, 1992). Interestingly, activation of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors, which are also coupled to the phosphoinositide turnover-calcium mobilization signal transduction pathway does induce a much smaller effect than angiotensin II, on *c-fos* expression, in isolated rat hepatocytes (González-Espinosa and García-Sáinz, 1992).

During the last years our group has characterized the  $\alpha_1$ -adrenoceptors expressed in the liver of several species. Interestingly, we have observed that different species express dif-

Correspondence to: J. Adolfo García-Sáinz, Inst. Fisiol. Celular, UNAM, Ap. postal 70-248, México D. F. 04510, México.

ferent subtypes (García-Sáinz and Macías-Silva, 1995; García-Sáinz *et al.*, 1992a; García-Sáinz *et al.*, 1992b). Rat hepatocytes express the  $\alpha_{1A}$ -adrenergic subtype, but, in contrast, liver cells from guinea pigs express an  $\alpha_1$ -adrenoceptors which has the pharmacological characteristics of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors (García-Sáinz and Macías-Silva, 1995; García-Sáinz *et al.*, 1992a; García-Sáinz *et al.*, 1992b). In guinea pig liver cells,  $\alpha_1$ -adrenergic agonists increase IP<sub>3</sub> production and calcium mobilization which lead to phosphorylase *a* activation (García-Sáinz *et al.*, 1992a; García-Sáinz *et al.*, 1992b). We have continued our studies using these cells and here we report that adrenergic activation induce the expression of *c-fos* and that both  $\alpha_{1A}$  and  $\beta_2$ -adrenoceptors are able to mediate this action.

## MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed using liver cells isolated from guinea pigs (220–250 g) by the method of Berry and Friend (1969) and were incubated in Krebs Ringer bicarbonate buffer under an atmosphere of 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, pH 7.4 at 37°C. To quantify *c-fos* expression, cells were incubated with the agents of interest, for 30 min (time of maximal expression, determined in preliminary experiments). After this incubation, hepatocyte RNA was immediately isolated using Trizolagent (Molecular Research Center) (Chomczynski and Sacchi, 1987). Integrity of total RNA was verified in agarose-formaldehyde gels stained with ethidium bromide. RNA was quantified by A<sub>260</sub> and equal amounts were spotted onto Nylon membranes. RNA was crosslinked and hybridized with nick translated *c-fos* probe as described (González-Espinosa and García-Sáinz, 1992). Filters were autoradiographed and the signals were analyzed using a DHU Beckman densitometer.

## RESULTS

Incubation of guinea pig hepatocytes with increasing concentrations of norepinephrine (in the presence of 10  $\mu$ M propranolol, to block its  $\beta$ -adrenergic activity) resulted in a dose-dependent increase in *c-fos* expression (Fig. 1). In some of these experiments the dose-response curve was biphasic with a first plateau (2–3-fold increase in *c-fos* expression) around 1  $\mu$ M and a second plateau (5-fold increase in *c-fos* expression) at 100  $\mu$ M. The catecholamine induced a 4–5-fold maximal increase with an EC<sub>50</sub> of  $\approx$  1  $\mu$ M (Fig. 1). This effect of noradrenaline (plus propranolol) was blocked by 10  $\mu$ M prazosin or 1  $\mu$ M 5-methyl-urapidil (Table 1), indicating a role of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors. Consistent with this, it was observed that methoxamine was also able to induce a dose-dependent increase in *c-fos* expression in these cells (Fig. 2); however, the maximal effect was consistently smaller (only 3-fold increase) than that of norepinephrine (plus propranolol). The adrenergic antagonists were without any effect by themselves on *c-fos* expression (data not shown).

Norepinephrine (in the absence of propranolol) induced an increase of 4–5-fold on *c-fos* expression with an EC<sub>50</sub> of  $\approx$  100 nM (two experiments in triplicate, data not shown). We tested the effect of the  $\beta$ -adrenergic agonist, isoproterenol, and observed that a maximal 3–4-fold increase in *c-fos* expression was induced by this agonist, with an EC<sub>50</sub> of  $\approx$  3 nM (Fig. 3). The effect of isoproterenol was blocked by propranolol indicating that the effect was mediated through  $\beta$ -adrenoceptors (Table 1).

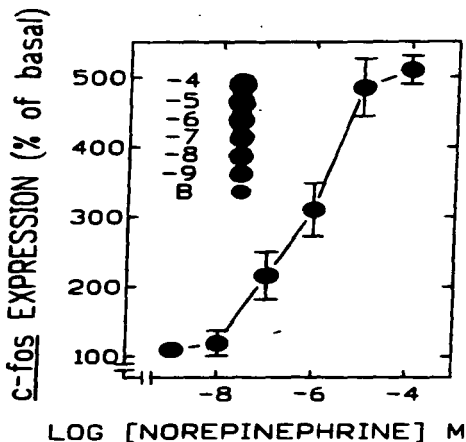


FIGURE 1 Effect of Norepinephrine (in the presence of propranolol) *c-fos* expression in isolated guinea pig hepatocytes. Cells were incubated with 10  $\mu$ M propranolol in the absence (basal) or presence of different concentrations of norepinephrine for 30 min. After this incubation *c-fos* expression was determined as indicated in Materials and Methods. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4 experiments using different cell preparations. Inset: representative autoradiogram.

TABLE I

Effect of adrenergic agents on *c-fos* expression in isolated guinea pig hepatocytes.

Agents	<i>c-fos</i> Expression (% of basal)
Basal	100
Norepinephrine 10 $\mu$ M plus propranolol 10 $\mu$ M	409 $\pm$ 51
Norepinephrine 10 $\mu$ M plus propranolol 10 $\mu$ M plus prazosin 10 $\mu$ M	175 $\pm$ 42
Norepinephrine 10 $\mu$ M plus propranolol 10 $\mu$ M plus 5-methyl-urapidil 1 $\mu$ M	86 $\pm$ 11
Isoproterenol 100 nM	295 $\pm$ 14
Isoproterenol 100 nM plus propranolol 10 $\mu$ M	109 $\pm$ 15

Results are the means  $\pm$  S.E.M. of 4-6 experiments using different cell preparations.

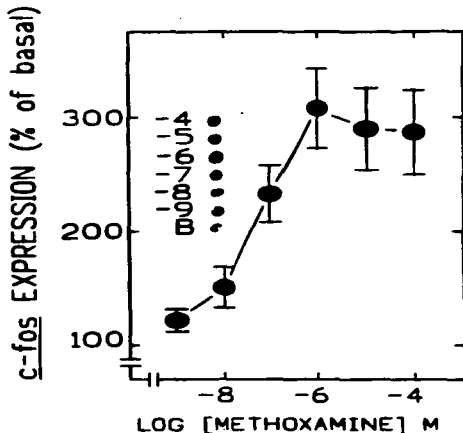


FIGURE 2 Effect on methoxamine on *c-fos* expression in isolated guinea pig hepatocytes. Cells were incubated in the absence (basal) or presence of different concentrations of methoxamine for 30 min. After this incubation *c-fos* expression was determined as indicated in Materials and Methods. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-7 experiments using different cell preparations. Inset: representative autoradiogram.

## DISCUSSION

The  $\alpha_1$  and  $\beta$ -adrenoceptors present in guinea pig liver have been characterized in binding and functional studies. It has been observed that membranes from guinea pig liver have a relatively modest number (40-80 fmol/mg protein) of  $\alpha_1$ -adrenoceptors with the pharmacological characteristics of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors (García-Sáinz and Romero-Avila, 1993; García-Sáinz *et al.*, 1992a; García-Sáinz *et al.*, 1995) and, in contrast, a very high number of  $\beta$ -adrenoceptors (= 5,000 fmol/mg protein) have been detected (Arinze and Kawai, 1983; Sulakhe *et al.*, 1988). Our present results are consistent with these findings and further indicate that both of them regulate proto-oncogene expression.

In the present study a marked shift to the right in the dose-response curve to norepinephrine was observed when propranolol was present; these data suggested that  $\beta$ -adreno-

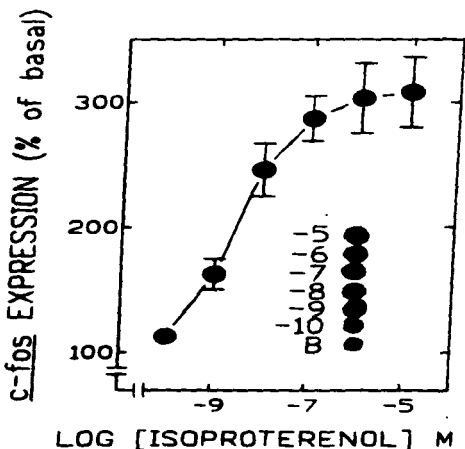


FIGURE 3 Effect of isoproterenol on *c-fos* expression in isolated guinea pigocytes. Cells were incubated in the absence (basal) or presence of different concentrations of isoproterenol for 30 min. After this incubation *c-fos* expression was determined as indicated in Materials and Methods. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-7 experiments using different cell preparations. Inset: representative autoradiogram.

ceptors participate in the action of the catecholamine and even that possibly the  $\beta$ -adrenergic response predominates at low concentrations of the agonist. This was confirmed by the ability of isoproterenol to stimulate *c-fos* expression and its blockade by propranolol. Similarly, the  $\alpha_1$ -adrenergic action was evidenced by the ability of norepinephrine (plus propranolol) and methoxamine to increase the expression of *c-fos* and by the blockade of their action by selective  $\alpha_1$ -adrenergic antagonists. The effect of methoxamine was observed at lower concentrations than those we anticipated, on the basis of our previous experiments on other parameters (García-Sáinz *et al.*, 1992b; García-Sáinz *et al.*, 1993).

It is clear that the maximal stimulation of this parameter induced by selective  $\alpha_1$ - (methoxamine) or  $\beta$ -adrenergic agonists (isoproterenol) was less than that obtained by a full agonist, such as norepinephrine, that activates both receptors. The effect of norepinephrine even in the presence of propranolol, could in fact have involved a minor  $\beta$ -adrenergic component which might have amplified the response.



It is interesting that  $\alpha_1$ -adrenergic activation in guinea pig hepatocytes induced a relatively big effect on *c-fos* expression, considering that these cells express a relatively modest number of  $\alpha_1$ -adrenoceptors. In contrast, in rat hepatocytes, that have a much bigger density of  $\alpha_1$ -adrenoceptors (500–1,000 fmol/mg membrane protein) (García-Sáinz *et al.*, 1992b; García-Sáinz *et al.*, 1995) adrenergic agonists induce a much smaller effect on this parameter (González-Espinoza and García-Sáinz, 1992). The  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype expressed by these cells is different, but certainly, many other differences may exist between the molecular repertoires that control gene expression in these hepatocytes.

Roles of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptors in modulating *c-fos* expression have been observed in many other cells including, among others, cardiac myocytes (Iwaki *et al.*, 1990), B104 neuroblastoma cells (Schilling *et al.*, 1991) and brown adipocytes (Thonberg *et al.*, 1994). Our present results include in this group the guinea pig hepatocytes. In some of these cells, expression of this proto-oncogene is associated to important effects on their structure and function. For example, in brown adipocytes *c-fos* expression seem to be associated to what is referred to as "recruitment", i. e., an enhanced capacity for thermogenesis which involves both cell proliferation and differentiation (Thonberg *et al.*, 1994). In cardiac myocytes *c-fos* expression is associated to a hypertrophic response which includes an increase in cell volume and accumulation of contractile proteins (Iwaki *et al.*, 1990). In liver, there is evidence that proto-oncogene expression is stimulated during processes that involve proliferation and differentiation such as liver regeneration (Krujjer *et al.*, 1986; Hsu *et al.*, 1992) or carcinogenesis (Porth-Hallstrom *et al.*, 1989). However, at this point, nothing is known about the phenotypic changes that *c-fos* expression induces in hepatocytes during hormonal stimulation. Certainly, an open area for further research.

#### Acknowledgements

This research was partially supported by Grants from DGAPA (IN 200193) and CONACYT (4711-N9406).

#### References

- Arisawa, I. J. and Kawai, Y. (1983) Adrenergic regulation of glycogenolysis in isolated guinea pig hepatocytes; evidence that  $\beta_2$ -receptors mediate catecholamine stimulation of glycogenolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 198–202.
- Berry, M. N. and Friend, D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.*, **43**, 506–520.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
- Curtin, T. and Morgan, J. L. (1987) Measurement of *fos*. *Bioassays*, **7**, 255–258.
- García-Sáinz, J. A. and Macías-Silva, M. (1995) Species heterogeneity of liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors. Subtypes, signal transduction and regulation. *Pharmacol. Commun.*, **6**, 53–60.
- García-Sáinz, J. A. and Romero-Avila, M. T. (1993) Characterization of the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors of guinea pig liver membranes: studies using [3H]15-methyl-urapidil. *Mol. Pharmacol.*, **44**, 589–594.
- García-Sáinz, J. A., Romero-Avila, M. T., Alcántara-Hernández, R., Macías-Silva, M., Olivares-Reyes, J. A. and González-Espinoza, C. (1992a) Species heterogeneity of hepatic  $\alpha_1$ -adrenoceptors:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1C}$  subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 760–767.
- García-Sáinz, J. A., Romero-Avila, M. T., Olivares-Reyes, J. A. and Macías-Silva, M. (1992b) Guinea pig hepatocyte  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur. J. Pharmacol.*, **227**, 239–245.

- García-Sáinz, J. A., Romero-Avila, M. T., Alcántara-Hernández, R. and Olivares-Reyes, J. A. (1993) Different sensitivity to methoxamine and oxymetazoline of hepatocytes expressing  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  or  $\alpha_{1C}$ -adrenoceptors. *Pharmacol. Commun.*, **2**, 339-344.
- García-Sáinz, J. A., Romero-Avila, M. T., Villalobos-Molina, R. and Minnerman, K. P. (1995)  $\alpha_1$ -Adrenergic subtype selectivity of tamulosin. Studies using liver from different species. *Eur. J. Pharmacol.*, **289**, 1-7.
- González-Espinosa, C. and García-Sáinz, J. A. (1992) Angiotensin II and active phorbol esters induce proto-oncogene expression in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1136**, 309-314.
- Hsu, J.-C., Bravo, R. and Ts'ao, R. (1992) Interaction among LRF-1, junB, *c-jun* and *c-fos* define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 4654-4665.
- Iwaki, K., Sukhazme, V. P., Shubetta, H. E. and Chien, K. R. (1990)  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. *fos/jun* Expression is associated with sarcome assembly. Erg-1 induction in primarily an  $\alpha_1$ -mediated response. *J. Biol. Chem.*, **265**, 13809-13817.
- Kruijer, W., Skelly, H., Botteri, F., van der Putten, H., Barber, J. R., Verma, I. M. and Leffert, H. L. (1986) Proto-oncogene expression in regenerating liver is stimulated in cultures of primary adult rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **261**, 7929-7993.
- Porah-Hällström, I., Blaeck, A., Eriksson, L. C. and Gustafson, J.-A. (1989) Expression of the *c-myc*, *c-fos* and *c-ras* proto-oncogenes during sex-differentiated rat liver carcinogenesis in the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis*, **10**, 1793-1802.
- Ransone, L. J. and Verma, I. M. (1990) Nuclear proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 539-557.
- Schilling, K., Luk, D., Morgan, J. I. and Curran, T. (1991) Regulation of a *fos-lacZ* fusion gene: a paradigm for quantitative analysis of stimulus-transcription coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5665-5669.
- Sulzha, S. J., Pulga, V. B. and Tran, S. (1988) Hepatic  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in various animal species. *Mol. Cell. Biochem.*, **83**, 81-88.
- Thomberg, H., Zhang, S.-J., Tvrdek, P., Jacobsson, A. and Nedergaard, J. (1994) Norepinephrine utilizes  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptors synergistically to maximally induce *c-fos* expression in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 33179-33186.

**ACTIVATION OF  $\alpha_1$ -ADRENOCEPTOR SUBTYPES INDUCES PROTO-ONCOGENE  
EXPRESSION. ROLE OF PROTEIN KINASE C.**

**J. Adolfo García-Sáinz, Rocío Alcántara-Hernández and José Vázquez-Prado**

**Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Apartado Postal 70-248; Mexico D. F. 04510. México**

**Short title:  $\alpha_1$ -Adrenoceptor activation induces *c-fos* and *c-jun* expression**

**Abbreviations used: PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate, 13-acetate. DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; SRE, serum response element;  $[Ca^{2+}]_i$ , intracellular calcium concentration.**

**Correspondence should be addressed to:**

**J. A. García-Sáinz  
Inst. Fisiol. Celular, UNAM  
Ap. postal 70-248  
México D. F. 04510  
México  
Tel 011 (525) 622 5612  
FAX 011 (525) 622 5613**

## SYNOPSIS

The ability of noradrenaline to induce the proto-oncogenes, *c-fos* and *c-jun*, was studied in rat-1 fibroblasts stably expressing the cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes. It was observed that activation of any of the cloned receptors induced a rapid and transient expression of these genes. The effects of noradrenaline were dose-dependent and could be blocked by prazosin indicating that were mediated through  $\alpha_1$ -adrenoceptors. The efficacy to induce the expression of *c-fos* was similar for the three cell lines ( $\alpha_{1a} \geq \alpha_{1b} = \alpha_{1c}$ ) but differ for *c-jun* ( $\alpha_{1a} \geq \alpha_{1b} > \alpha_{1c}$ ). The  $EC_{50}$  values were also different:  $\approx 5$  nM (*c-fos*) and  $\approx 300$  nM (*c-jun*) for cells transfected with the  $\alpha_{1a}$  subtype,  $\approx 30$  nM (*c-fos*) and  $\approx 300$  nM (*c-jun*) for cells transfected with the  $\alpha_{1b}$  subtype and  $\approx 300$  nM (*c-fos* and *c-jun*) for those transfected with the  $\alpha_{1c}$  subtype.

A prominent role of protein kinase C in mediating the  $\alpha_1$ -adrenergic actions on proto-oncogene expression was evidenced by the ability of either staurosporine or protein kinase C down regulation to block such effects. In contrast, the effects of endothelin 1 on the expression of *c-fos* and *c-jun* were unaffected either by staurosporine or by the down regulation of the enzyme.

It is concluded that activation of any of the three cloned subtypes can induce *c-fos* and *c-jun* expression of and that protein kinase C plays a major role in mediating such effects. These actions are probably involved in the long-term effects induced by  $\alpha_1$ -adrenergic activation.

## INTRODUCTION

$\alpha_1$ -Adrenoceptors mediate some of the physiological actions of the sympathetic nervous system and of the circulating natural catecholamines, adrenaline and noradrenaline [1]. These receptors are members of the G-protein coupled family of receptors, and constitute an heterogeneous subfamily of which three members have been cloned [for reviews see 2-4]. They are referred as  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, as recommended by the International Union of Pharmacology Committee for Receptor Nomenclature and Drug Classification [5].

$\alpha_1$ -Adrenergic activation results in immediate responses such as synaptic transmission, arteriolar smooth muscle constriction, cardiac contraction or hepatic glycogenolysis [1]. In addition to these immediate responses,  $\alpha_1$ -adrenoceptors play important roles in longer term actions, such as modulation of cellular phenotype and cell growth and proliferation [6-11]. These longer term actions of catecholamines are physiologically important and could be implicated in the pathogenesis of diseases such as benign prostatic hyperplasia [1].  $\alpha_1$ -Adrenoceptors modulate growth and proliferation in smooth muscle cells [9-11] and mediate hypertrophy of myocardial cells [6-8]. In addition, cells expressing constitutively active  $\alpha_1$ -adrenoceptor mutants exhibit enhanced mitogenesis and tumorigenicity [12]. The myocardial expression of these active  $\alpha_1$ -adrenoceptors induces cardiac hypertrophy in transgenic mice [13].

An initial action, usually observed in response to agents that modulate cell growth and proliferation, such as hormones, neurotransmitters and growth factors, is the expression of the so-called, immediate early genes [14-17]. Among these early genes are *c-fos* and *c-jun*, whose products, Fos and Jun, constitute AP-1, a transcription factor that has been regarded as a nuclear third messenger, that couples short-term stimulations to long-term actions by regulating the expression

of target genes [14-17].

There is evidence that  $\alpha_1$ -adrenergic activation induces *c-fos* expression in a variety of cells including among others, cardiac myocytes [18], vascular smooth muscle cells [10], neuroblastoma cells [19], brown adipocytes [20] or hepatocytes [21, 22]. Different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes seem to be involved in modulating *c-fos* expression in these cells, and in some cases more than one subtype participate. Comparison of these effects is complicated since different cells, that express different subtypes and with different receptor densities were employed. The purpose of this study was to investigate the potential role of the different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes on the expression of *c-fos* and *c-jun* and the possible participation of protein kinase C (PKC) in such effects. We took advantage of the availability of rat-1 fibroblasts transfected with the different cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes, that stably express similar densities of such receptors [23].

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials.**

1-Noradrenaline, di-propranolol, endothelin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), staurosporine, bovine serum albumin (fraction V), Triton X-100, 2-mercaptoethanol and soybean trypsin inhibitor were obtained from Sigma Chemical Co. Specific polyclonal antibodies against PKC isozyme peptides (anti-PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$ ), DMEM, fetal bovine serum, trypsin, antibiotics and other reagents used for cell culture were from GIBCO BRL. Nylon membranes, nick translation kits, dCTP (6000 Ci/mmol), biotinylated anti-rabbit Ig, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, ECL™ Western blotting detection reagents and the *c-fos* Amprobe were from Amersham. The *c-jun* probe (JAC.1 clone, 63026 plasmid) was from the American Type Culture Collection. Restriction

enzymes were obtained from New England Biolabs.

#### **Cell culture.**

Rat-1 fibroblasts clones stably expressing the different cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptors ( $\alpha_{1a}$ , cloned from bovine brain [24],  $\alpha_{1b}$ , cloned from DDT<sub>1</sub> MF-2 cells [25] and  $\alpha_{1c}$ , cloned from rat brain [26]) were kindly provided by Drs. L. Allen, R. J. Lefkowitz and M.G. Caron (Duke University, Durham, NC). Cells were grown as described [23] in glutamine-containing high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin and 0.25  $\mu$ g/ml amphotericin B at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For selection, cells were grown in the presence of the neomycin analogue G-418 sulfate (300  $\mu$ g/ml).

#### **Proto-oncogene expression.**

Total RNA was obtained according to the method of Chomczynski and Sacchi [27]; integrity of total RNA was verified in agarose-formaldehyde gels stained with ethidium bromide. RNA was quantified by A<sub>260</sub> and equal amounts were spotted onto Nylon membranes. RNA was crosslinked, and hybridized under conditions of high stringency with nick translated probes, as described [21, 28, 29]. Hybridization probes were as follows: human *c-fos* probe was the 615 bp *EcoRI-PstI* fragment of Amprobe *c-fos*; mouse *c-jun* was the 2.6 kb *EcoRI-EcoRI* fragment of JAC.1 clone (63026 plasmid) and, as a control, a cDNA clone of GAPDH [30] was used. The fragments are highly conserved among species and gave very clear signals in Northern and dot blot analysis. Filters were autoradiographed 5-7 days at -70 °C. The films were scanned and analyzed using a DHU Beckman densitometer. Levels of expression were always normalized to the basal, i. e., expression in the

absence of stimulus.

#### **Protein Kinase C Western Blots.**

Confluent rat-1 fibroblasts cultured in 10-cm Petri dishes were scraped with a rubber policeman and homogenized in buffer [31] containing: 20 mM Tris (pH 7.5) 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50 mM 2-mercaptoethanol and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. The cells were homogenized with an ultraturrax for 20s and the homogenate maintained at 0-5 °C for 30 min before being centrifuged at 28,000 X g for 20 min. The pellets were discarded and protein determined in the supernatants by the method of Lowry et al. [32] using bovine serum albumin as standard. Samples (40  $\mu$ g/lane) were separated by 10% SDS-PAGE followed by electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes. Immunoblots were performed using specific polyclonal antibodies against protein kinase C isozyme peptides, biotinylated anti-rabbit Ig, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate and ECL™ Western blotting detection reagents as indicated by the suppliers.

#### **RESULTS**

Noradrenaline (10  $\mu$ M in the presence of 10  $\mu$ M propranolol to block  $\beta$ -adrenergic effects) induced rapid and transiently the expression of proto-oncogenes *c-fos* and *c-jun* in cells transfected with any of the three cloned subtypes (Fig. 1). The adrenergic agonist induced a marked expression of *c-fos* which reached its maximum at 30 min and then rapidly returned towards basal expression. The time-courses and the magnitude of the effects were very similar in fibroblasts that expressed the different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes (Fig. 1, upper panel). Noradrenaline (plus propranolol) also



rapidly induced *c-jun* expression in cells transfected with any of the three cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes which reached its maximum also at 30 min. However, the return towards basal levels of expression was slower for this proto-oncogene than for *c-fos* and the effect observed with cells transfected with the  $\alpha_{1a}$  subtype was consistently smaller than those in cells transfected with the other subtypes (Fig. 1, lower panel). The noradrenaline-induced expression of these proto-oncogenes was abolished in the presence of 1  $\mu$ M prazosin, confirming that such effects were mediated through  $\alpha_1$ -adrenoceptors (data not shown).

The dose-response curves to noradrenaline (in the presence of 10  $\mu$ M propranolol) for the expression of *c-fos* and *c-jun* are presented in Figs. 2 and 3, respectively. It can be observed that noradrenaline induced dose-dependent increases of *c-fos* expression in the three cell lines. The magnitude of the effects were very similar with the order of efficacy:  $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} = \alpha_{1c}$ . Interestingly, the potency of noradrenaline to induce *c-fos* were significantly different for these cell lines. The  $EC_{50}$  values were:  $5 \pm 1$  nM for cells transfected with the  $\alpha_{1a}$  subtype,  $30 \pm 5$  nM for cells transfected with the  $\alpha_{1b}$  subtype and  $300 \pm 65$  nM for those transfected with the  $\alpha_{1c}$  subtype (data are the means  $\pm$  S. E. M. of 7-10 determinations using different cell cultures)(Fig. 2).

Noradrenaline induced in dose-dependent fashion the expression of *c-jun* in the three lines (Fig. 3). In contrast to what was observed for the expression of *c-fos*, no adrenergic effect was observed on the expression of *c-jun* at concentrations below 100 nM in any of the cell lines (data not shown). In addition, the efficacies were clearly different, i. e., noradrenaline induced a slightly bigger effect in cells transfected with the  $\alpha_{1a}$  subtype than in those transfected with the  $\alpha_{1b}$  subtype but in cells transfected with the  $\alpha_{1c}$  receptor the effect was much smaller. Interestingly, the potencies were very similar with  $EC_{50}$  values of  $\approx 300$  nM (Fig. 3).

It is well known that activation of PKC leads to expression of *c-fos* and *c-jun* in many cells [14-17]. PMA (1  $\mu$ M) increased ~ 2-fold *c-fos* and *c-jun* expression in the three cell lines (Fig. 4). Staurosporine (10  $\mu$ M) an inhibitor of PKC, did not affect basal expression of these proto-oncogenes (data not shown) but abolished the actions of PMA (Fig. 4). It is also known that sustained activation of PKC with active phorbol esters induced down-regulation of the enzyme and cell refractoriness to PMA [33]. Pretreatment (18 hs) of rat-1 fibroblasts with PMA depletes the cells of measurable PKC activity [34]. In our studies cells preincubated overnight (= 18 h) with 100 nM PMA showed an increase (= 30-50%) in the basal expression of *c-fos* and *c-jun* when compared to parallel incubations in the absence of PMA (data not shown). In cells preincubated overnight with PMA the acute addition of 1  $\mu$ M of this phorbol ester did not further increase proto-oncogene expression (Fig. 4).

In all these experiments, filters containing identical samples were hybridized with the GAPDH gene probe without detecting any significant change in response to the adrenergic agonists or active phorbol esters (data not shown), indicating that such actions were not general effects on gene transcription but rather specific effects on the expression of early genes.

In order to explore the role of PKC in the  $\alpha_1$ -adrenergic-stimulated proto-oncogene expression the effects of staurosporine and overnight pretreatment with PMA were studied. It was observed that overnight pretreatment with PMA markedly inhibited the effect of noradrenaline on the expression of *c-fos* (Fig. 2 and 5) and *c-jun* (Fig. 3 and 5) in the cell lines transfected with any of the cloned receptor subtypes. Similarly, staurosporine inhibited the effect of noradrenaline on proto-oncogene expression in the three cell lines (Fig. 5).

Endothelin 1 is a potent activator of proto-oncogene expression in rat-1 fibroblasts [34-36].

In the cell lines studied here, we observed that this peptide induce 2-3-fold increases in the expression of *c-fos* and *c-jun*. The magnitude of the stimulations was similar for the three cell lines and, interestingly, the effect of the peptide was not blocked by either staurosporine or by the overnight pretreatment with PMA (Fig. 5).

In order to gain further insight on the role of the different PKC isoforms in the induction of proto-oncogene expression, the effect of overnight treatment with PMA on the relative amounts of different PKC isoforms was evaluated by Western blot analysis. It is known that rat-1 fibroblasts express the PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$  isoforms [37]. It can be observed in Fig. 6 that sustained activation of PKC with this phorbol ester markedly decreased the immunologically detectable  $\alpha$  ( $80 \pm 5\%$  decrease; mean  $\pm$  S.E.M., n=3),  $\delta$  ( $75 \pm 5\%$  decrease; mean  $\pm$  S.E.M., n=3), and  $\epsilon$  ( $66 \pm 5\%$  decrease; mean  $\pm$  S.E.M., n=3) isoforms with little change in the detectable amount of the  $\zeta$  isoform ( $3 \pm 2\%$  decrease; mean  $\pm$  S.E.M., n=3) (Fig. 6).

## DISCUSSION

Our present results clearly indicate that activation of any of the three cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes results in the expression of early genes such as *c-fos* or *c-jun* and that PKC plays a key role in mediating such effects. However, it is also clear that some differences exist. Such differences do not seem to be related to the density of the receptors since they are very similar in the three cell lines [23]. We have observed that the order of efficacy of these receptors to increase [ $^3\text{H}$ ]IP $_3$  production and [ $\text{Ca}^{2+}$ ] $_i$  is:  $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} > \alpha_{1c}$  [23]. Recently, an identical order of coupling efficiency ([ $^3\text{H}$ ]IP $_3$  production and [ $\text{Ca}^{2+}$ ] $_i$ ) was reported for the human  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes [38]. The same order of efficacy was observed in the present study for *c-jun* expression (Fig. 3) but the results

obtained for *c-fos* expression ( $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} = \alpha_{1c}$ ) markedly differ (Fig. 2). The  $EC_{50}$  values determined in the studies on signal transduction ( $[^3H]IP_3$  production and  $[Ca^{2+}]_i$ , = 200-500 nM [23]) are very similar to those for *c-jun* expression (= 300 nM) but again, they are markedly different from those observed for *c-fos* expression (5, 30 and 300 nM for cells transfected with  $\alpha_{1a}$ -,  $\alpha_{1b}$ - or  $\alpha_{1c}$ -adrenoceptors, respectively). Interestingly, there is good correlation between the sensitivity to noradrenaline for *c-fos* expression ( $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} > \alpha_{1c}$ ) and the order of efficacy for signal transduction ( $[^3H]IP_3$  production and  $[Ca^{2+}]_i$  [23]).

It is clear that very different levels of receptor occupation were required to induce the expression of *c-fos* and *c-jun* through  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptors (60-fold difference in  $EC_{50}$  values), and that for the other receptor subtypes either the difference was smaller ( $\alpha_{1b}$ -adrenoceptor, 10-fold difference in  $EC_{50}$  values) or there was no difference ( $\alpha_{1c}$ ). These data are puzzling and the interpretation challenging. It is possible that one of the pathways for proto-oncogene (*c-fos*) expression could be more sensitive to the amplification of the signaling cascade than the other (*c-jun*), and/or that additional signaling devices could participate and magnify the responses. On the one hand,  $\alpha_1$ -adrenoceptors are known to activate the phosphoinositide turnover/calcium mobilization signal transduction system but there is evidence that other signaling pathways may also be activated by these receptors and that they can participate in some of the actions [2-4]. On the other hand, although both *c-fos* and *c-jun* are rapidly and transiently expressed in many cells, this is not always coregulated [17]. Expression is the result of the balance between gene transcription and mRNA degradation. It is clear that expression of early genes is due to both increased transcription [14-17] and regulation of mRNA stability [39]. The signaling pathways employed to modulate transcription of these proto-oncogenes seem to differ; i. e., the signal transduction pathways for *c-fos* induction

appear to converge at the SRE of the *c-fos* promoter whereas induction of *c-jun* expression seems to occur at a AP-1 site [17].

PKC seems to play a cardinal role in mediating the  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation of proto-oncogene expression as evidenced by the blockade by both staurosporine and the overnight treatment with PMA. The down regulation observed for the  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  isoforms of this kinase suggest that they may be involved in such effects. It is interesting to mention that a similar treatment abolished the blockade of the  $\alpha_1$ -adrenergic actions induced by PKC activation [23]; this suggests that such isoforms of PKC may be also involved in the functional modulation of these receptors. It is clear that the role of each one of the different isoforms in these actions needs to be directly addressed.

The action of endothelin 1 was an important control in these experiments. It is clear that down regulation of PKC or inhibition of this family of enzymes did not block the expression of proto-oncogenes induced by the peptide. These data are consistent with previous demonstration that the ability of endothelin 1 to induce second messenger production and transcription of *c-fos* and *c-jun* are largely independent of PKC activity in rat-1 fibroblasts [34]. Calcium [35] and transactivation of the EGF receptor [36] seem to play prominent roles in the action of this potent endothelial peptide on proto-oncogene expression.

In summary, our data clearly indicate that activation of any of the three cloned subtypes can induce the expression of *c-fos* and *c-jun* and that PKC plays a major role in mediating such effects. Differences in the magnitude of the responses and in the sensitivity to noradrenaline were evidenced. These actions are likely involved in the long-term actions induced by  $\alpha_1$ -adrenergic activation.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was partially supported by a Grant from DGAPA (IN200596). The authors express their gratitude to Dr. Claudia González-Espinosa for her help and advice. The authors express their gratitude to Drs L. Allen, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz for the donation of the rat-1 fibroblast cell lines. This research was partially supported by a Grant from DGAPA (IN200596).

## REFERENCES

1. Hoffman, B. B. and Lefkowitz, R. J. (1996) in Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Edn. (Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W. and Gilman, A. G., eds.) pp. 199-248, McGraw-Hill, New York
2. Minneman, K. P. and Esbenshade, T. A. (1994) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 117-133
3. Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J. and Piasck, M. T. (1996) *Circ. Res.* **78**, 737-749
4. García-Sáinz, J. A. (1993) *Cell. Signalling* **5**, 539-547
5. Hieble, J. P., Bylund, D. B., Clarke, D. E., Eikenburg, D. C., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P. and Ruffolo, R. R., Jr. (1995) *Pharmacol. Rev.* **47**, 267-270
6. Simpson, P. (1983) *J. Clin. Invest.* **72**, 732-738
7. Rokosh, D. G., Stewart, F. R., Chang, K. C., Beiley, B. A., Karliner, J. S., Camacho, S. A., Long, C. S. and Simpson, P. C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 5839-5843
8. Knowlton, K. U., Michel, M. C., Itani, M., Shubeita, H. E., Ishihara, K., Brown, J. H. and Chien, K. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15374-15380
9. Chen, L., Xin, X., Eckhart, A. D., Yang, N. and Farber, J. E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30980-30988
10. Okazaki, M., Hu, Z.-W., Fuginaga, M. and Hoffman, B. B. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 210-218
11. Hu, Z.-W., Shi, X.-Y., Lin, R. Z. and Hoffman, B. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8977-8982
12. Allen, L. F., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Cotecchia, S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11354-11358
13. Milano, C. A., Dolber, P. C., Rockman, H. A., Bond, R. A., Venable, M. E., Allen, L. F. and

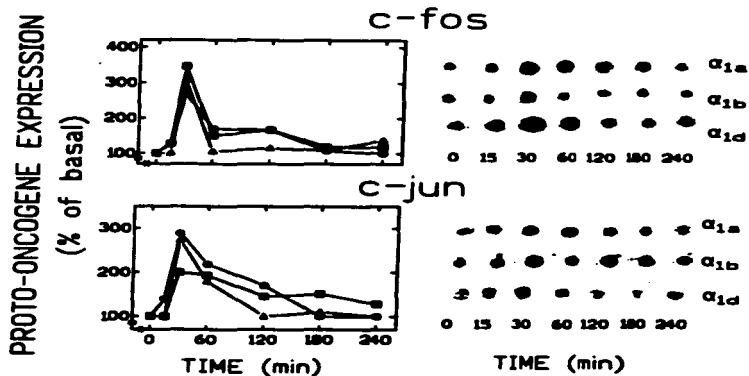
- Lefkowitz, R. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10109-10113
14. Curran, T. and Morgan, J. I. (1987) *Bioessays* **7**, 255-258
  15. Ransone, L. J. and Verma, I. M. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 539-557
  16. Treisman, R. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 423-426
  17. Herschman, H. R. (1991) *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 281-319
  18. Iwaki, K., Sukhatme, V. P., Shubeita, H. E. and Chien, K. R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13809-13817
  19. Schilling, K., Luk, D., Morgan, J. I. and Curran, T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5665-5669
  20. Thonberg, H., Zhang, S.-J., Tvrdik, P., Jacobson, A. and Nedergaard, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 33179-33186
  21. González-Espinosa, C. and García-Sáinz, J. A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1136**, 309-314
  22. García-Sáinz, J. A. and Alcántara-Hernández, R. (1996) *Pharmacol. Commun.* **7**, 107-113
  23. Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J. A. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 17-22
  24. Schwinn, D. A., Lomasney, J. W., Lorenz, W., Szklut, P. J., Frameau, R. T., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Cotecchia, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8183-8189
  25. Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Kobilka, B. K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7159-7163
  26. Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W.-Y., Schwinn, D. A., Yang-Feng, T. L., Brownstein, M., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6365-6369
  27. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159



28. González-Espinosa, C. and García-Sáinz, J. A. (1995) *Life Sci.* **56**, 723-728
29. González-Espinosa, C. and García-Sáinz, J. A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1310**, 217-222
30. Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., Sabrouy, S. E., Dani, C., Jeanteur, P. and Blanchard, J. M. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 1431-1442
31. Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R. and García-Sáinz, J. A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 77-84
32. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
33. Rodríguez-Peña, A. and Rozengurt, E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 1053-1059
34. Muldoon, L. L., Pribnow, D., Rodland, K. D. and Magun, B. E. (1990) *Cell Reg.* **1**, 379-390
35. Pribnow, D., Muldoon, L. L., Fajardo, M., Theodor, L., Chen, L.-Y. S. and Magun, B. E. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 1003-1012
36. Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1996) *Nature* **379**, 557-560
37. Berti, L., Mosthaf, L., Kroder, G., Kellerer, M., Tippmer, S., Mushack, J., Seffer, E., Seedorf, K. and Haring, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3381-3386
38. Theroux, T. L., Esbenshade, T. A., Peavy, R. D. and Minneman, K. P. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 1376-1387
39. Schiavi, S. C., Belasco, J. G. and Greenberg, M. E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1114**, 95-106

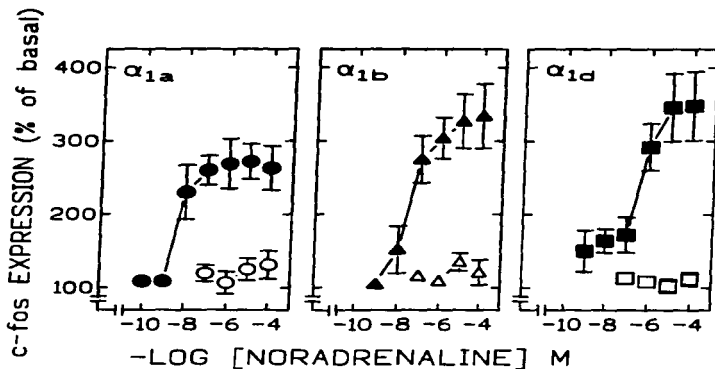
**Fig. 1. Time-course of the  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation of proto-oncogene expression in rat-1 fibroblasts.**

Cells stably transfected with the cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes ( $\alpha_{1a}$ , circles;  $\alpha_{1b}$ , triangles and  $\alpha_{1c}$ , squares) were incubated with 10  $\mu$ M noradrenaline (plus 10  $\mu$ M propranolol) for the times indicated and the expression of *c-fos* (upper panels) and *c-jun* (lower panels) was determined. Data are presented as percentage of basal (absence of agonist) expression for each cell line and condition. In the left panels the average of 3 experiments using different cell cultures is presented (standard error bars were omitted for clarity) and in the right panels representative autoradiograms are shown.



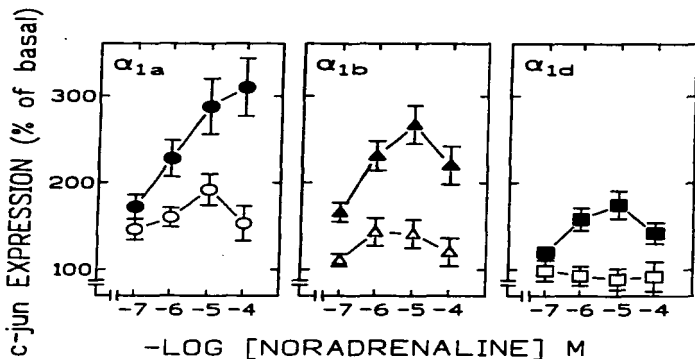
**Fig. 2. Effect of noradrenaline on *c-fos* expression in rat-1 fibroblasts and role of PKC down regulation.**

Cells stably transfected with the cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes ( $\alpha_{1a}$ , circles;  $\alpha_{1b}$ , triangles and  $\alpha_{1d}$ , squares) were preincubated overnight in the absence (closed symbols) or presence (open symbols) of 100 nM PMA and further incubated in the presence of different concentrations of noradrenaline (plus 10  $\mu$ M propranolol) for 30 min. Data are presented as percentage of basal expression for each cell line and condition. Plotted are the means and vertical lines represent the S. E. M. of 7-10 determinations using different cell cultures (where no error bar is presented the value within the symbol).



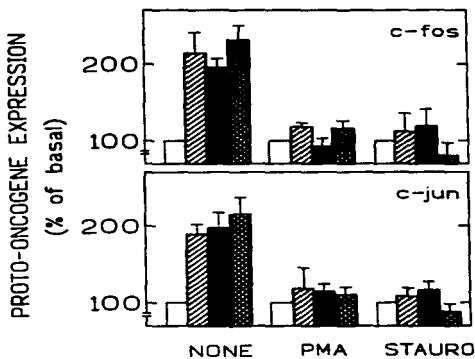
**Fig. 3. Effect of noradrenaline on *c-jun* expression in rat-1 fibroblasts and role of PKC down regulation.**

Cells stably transfected with the cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes ( $\alpha_{1a}$ , circles;  $\alpha_{1b}$ , triangles and  $\alpha_{1d}$ , squares) were preincubated overnight in the absence (closed symbols) or presence (open symbols) of 100 nM PMA and further incubated in the presence of different concentrations of noradrenaline (plus 10  $\mu$ M propranolol) for 30 min. Data are presented as percentage of basal expression for each cell line and condition. Plotted are the means and vertical lines represent the S. E. M. of 7-10 determinations using different cell cultures (where no error bar is presented the value is within the symbol).



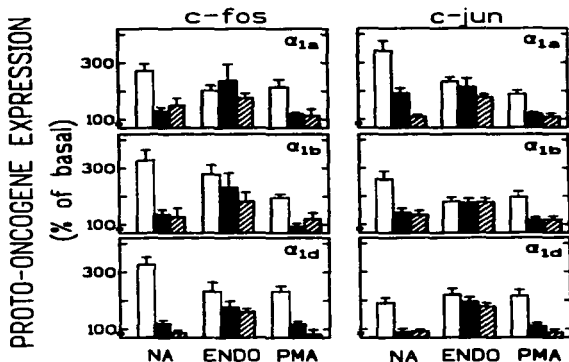
**Fig. 4. Role of PKC on proto-oncogene expression in rat-1 fibroblasts.**

Cells stably transfected with the cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes ( $\alpha_{1a}$ , hatched bars;  $\alpha_{1b}$ , solid bars and  $\alpha_{1c}$ , crisscrossed bars) were preincubated overnight in the absence (NONE and STAURO) or presence (PMA) of 100 nM PMA and further incubated in the presence of 1  $\mu$ M PMA (NONE and PMA) or 1  $\mu$ M PMA plus 10  $\mu$ M staurosporine (STAURO) for 30 min. Data are presented as percentage of basal expression for each cell line and condition. Plotted are the means and vertical lines represent the S. E. M. of 7-10 determinations using different cell cultures.



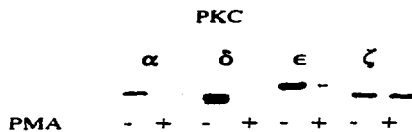
**Fig. 5. Effects of noradrenaline, endothelin 1 and PMA on proto-oncogene expression in rat-1 fibroblasts.**

Cells stably transfected with the cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes ( $\alpha_{1a}$ , upper panels;  $\alpha_{1b}$ , middle panels and  $\alpha_{1d}$ , lower panels). Open bars represent cells preincubated without any agent and incubated 30 min with the agent indicated; solid bars represent cells preincubated overnight with 100 nM PMA and incubated 30 min with the agent indicated; hatched bars represent cells preincubated without any agent and incubated 30 min with the agent indicated plus 10  $\mu$ M staurosporine. NA, noradrenaline 10  $\mu$ M plus 10  $\mu$ M propranolol, ENDO, 10 nM endothelin 1. Data are presented as percentage of basal expression for each cell line and condition. Plotted are the means and vertical lines represent the S. E. M. of 5-7 determinations using different cell cultures.



**Fig. 6. Effect of overnight treatment with PMA on the immunological detectable amounts of PKC isoforms.**

A representative immunoblot is presented of 5-6 performed.



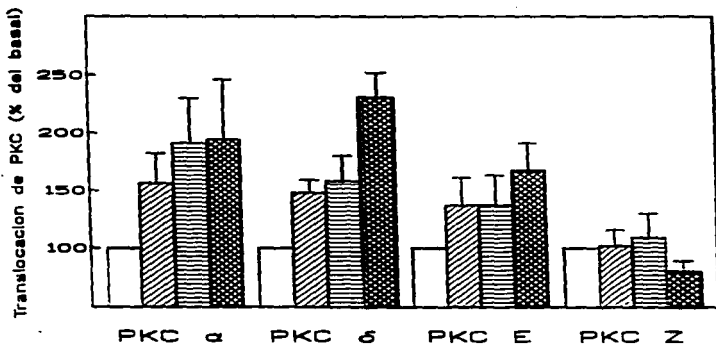


Fig.7. TRANSLOCACION DE LAS ISOFORMAS DE PKC EN CELULAS Rat-1. La fracción membranal de células control o tratadas por 5 min con norepinefrina 10 μM + propranolol 10 μM , Et-1 100 nM y PMA 1 μM se analizó en geles de poli(acrilamida)-bis-acrilamida al 10%-SDS. Las isoformas , , y de PKC se detectaron por inmunoblot con los anticuerpos correspondientes. Los valores son el promedio +/- el error estándar de 4 experimentos independientes.



## DISCUSIÓN

La expresión de genes de inducción temprana implica una serie coordinada de sucesos que transducen las señales extracelulares de la membrana plasmática, con la generación de segundos mensajeros, hasta el núcleo de la célula. Los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* tienen productos que son prototipo de factores de transcripción que al homo- o heterodimerizar forman a AP-1 (89 y 90), factor que actúa como un switch molecular, esencialmente como un tercer mensajero que controla los programas genéticos al producir cambios en la maquinaria transcripcional (91) al unirse este a sitios específicos del DNA de una gran cantidad de genes que participan en fenómenos celulares de largo plazo, tales como la diferenciación, la hipertrofia o la proliferación (89, 90, 92, 96, 98, 99, 100 y 101). La expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* es rápidamente inducida por toda una colección de señales extracelulares (90), por lo que son varias las vías de transducción las que participan en su regulación (96, 110, 111, 112, 113 y 114), sin que a la fecha estén completamente esclarecidas.

Para nosotros, es particularmente interesante el estudio de los receptores adrenérgicos, su caracterización, regulación y función en procesos celulares específicos. Existen evidencias contundentes de que los receptores adrenérgicos tienen la capacidad de inducir la expresión de algunos genes que tienen como productos a proteínas que participan en el metabolismo de la célula (76, 77 y 78). Así mismo, otros grupos y nosotros (como parte del trabajo experimental de esta tesis) observamos que tanto los receptores  $\alpha_1$ - como los  $\beta$ -adrenérgicos, los cuales activan efectores distintos, tienen también la capacidad de estimular la expresión de genes de inducción temprana, en particular *c-fos* y *c-jun*, en distintos sistemas celulares (83, 84, 85 y 88). En algunos casos, la expresión de estos proto-oncogenes se relaciona directamente con fenómenos celulares como la hipertrofia cardíaca (83 y 84) o con la diferenciación (85).

En cuanto a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, sabemos que su expresión es tejido-específico (44), y que existe una gran heterogeneidad de los diferentes subtipos de receptores expresados en el mismo órgano de especies distintas, al menos así lo muestra la caracterización farmacológica y bioquímica de estos receptores presentes en el hígado de varias especies. El hígado del pez, pollo, rata, ratón y hámster expresa el subtipo  $\alpha_{1b}$  (124, 125, y 126); el hígado del mono rhesus coexpresa los subtipos  $\alpha_{1a}$  y  $\alpha_{1b}$  (127) y el hígado de humano expresa el subtipo  $\alpha_{1a}$  (128). El significado funcional de la expresión de uno u otro receptor no se conoce, por ello se han enfocado grandes esfuerzos al estudio de la funcionalidad y de la regulación de los receptores  $\alpha_1$  por varios grupos de trabajo en esta área. Algunas evidencias por nuestro grupo sugieren que existen diferencias importantes al respecto entre los tres subtipos, aún si bien, todos se acoplan al sistema de recambio de fosfoinosítidos y movilización de calcio por medio de las proteínas Gq y todos generan los segundos mensajeros IP<sub>3</sub> y DAG por la activación de la FLC  $\beta$  (44). Al parecer los receptores  $\alpha_1$  tienen además, la capacidad de acoplarse a distintos efectores ya que se les asocia con fenómenos particulares, dependiendo del subtipo de receptor (63, 64, 65 y 66) sin olvidar que, estas diferencias pueden tener que ver con el sistema celular y con la maquinaria celular de cada uno. Se han reportado diferencias en la sensibilidad que tienen estos tres receptores a varias hormonas, medida como generación de segundos

mensajeros (129). Los subtipos  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1d}$  son fosforilados con diferente sensibilidad por la acción de la PKC, fosforilación que induce la desensibilización de los receptores (70).

Los resultados obtenidos del trabajo experimental nos permiten decir que la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* en las líneas celulares Rat-1 que expresan los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos muestra diferencias significativas y claras entre la activación de uno u otro subtipo de receptor. El orden de eficacia para inducir la expresión de *c-fos* por estos receptores es:  $\alpha_{1d} > \alpha_{1b} > \alpha_{1a}$  y para *c-jun* es:  $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} > \alpha_{1d}$ . Los valores de las  $EC_{50}$  obtenidas de las dosis-respuestas a la norepinefrina por los tres subtipos, indican que se requieren diferentes niveles de ocupación de los receptores por el agonista para inducir la transcripción de uno u otro proto-oncogene. Las  $EC_{50}$  para la expresión de *c-fos* son: 5 nM para el  $\alpha_{1a}$ , 30 nM para el  $\alpha_{1b}$  y 300 nM para el  $\alpha_{1d}$ ; y para la expresión de *c-jun* son: 300 nM en todos los casos. Este orden es idéntico al reportado de los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  de humanos (130), y un orden igual para estos dos parámetros se reportó en las células Rat-1 transfectadas con los tres subtipos (70).

Es importante señalar que las diferencias observadas no se deben a diferencias en el número de receptores entre una línea celular y otra. Por ensayos de unión del ligando radioactivo ( $^3H$  Prazosina) al receptor, se reportó que las tres líneas celulares tienen una densidad de receptores muy similar (70). En la línea celular que expresa el receptor  $\alpha_{1a}$  se determinó una  $B_{max} = 1.04 \pm 0.12$  pmol/mg de proteína y una  $KD = 0.36 \pm 0.04$ ; en la línea celular que expresa el  $\alpha_{1b}$  se determinó una  $B_{max} = 2.04 \pm 0.47$  pmol/mg de proteína y una  $KD = 0.36 \pm 0.04$  y en la línea celular que expresa el  $\alpha_{1d}$  una  $B_{max} = 0.79 \pm 0.11$  pmol/mg de proteína y una  $KD = 0.29 \pm 0.29$  (70). Por otra parte, si estas diferencias aunque pequeñas fueran significativamente importantes en la funcionalidad del receptor entonces, en hepatocitos aislados de cuyo que expresan el subtipo  $\alpha_{1a}$ , en donde por estudios de *binding*, se obtiene una  $B_{max} = 36$  fmol/mg de proteína, comparada con la  $B_{max} = 500-900$  fmol/mg de proteína de receptores  $\alpha_{1b}$  expresados en el hígado de rata, ratón y hámster, esperaríamos que se observara un incremento más grande en la generación de segundos mensajeros ( $IP_3$  y calcio) en las células que expresan el subtipo  $\alpha_{1b}$ , ya que la densidad de receptores es mayor, y no sucede así. En células hepáticas de cuyo el incremento en la producción de  $IP_3$  es de 3.5 veces con respecto al valor basal, mientras que en hepatocitos de rata es sólo de 2 veces; y en cuanto a la liberación de calcio, únicamente hay una diferencia entre uno y otro de 0.5 veces, ya que los valores son 2 y 2.5 veces, por la acción del receptor  $\alpha_{1a}$  y  $\alpha_{1b}$  respectivamente.

Por otro lado, las diferencias en la expresión de *c-fos* y *c-jun* tampoco se deben a diferencias en los valores de expresión basal entre las tres líneas celulares. En unidades arbitrarias obtenidas de la densitometría, se observa que los valores correspondientes al basal de cada línea celular en la expresión de *c-fos* y *c-jun* son similares entre sí. Además, la expresión del gene de la *GAPDH* no cambia en respuesta al agonista o al PMA (ver en métodos el dot blot) por lo que se utilizó como el control de los experimentos.

Estas diferencias en la expresión de uno u otro proto-oncogene en respuesta a los tres subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos probablemente sean relevantes para la fisiología de la célula. La expresión de *c-fos* y *c-jun* no es co-regulada, aunque los dos proto-oncogenes se expresen en una misma célula, algunas de las señales extracelulares son específicas para inducir *c-fos* o para inducir *c-jun*; además, sus promotores tienen sitios reguladores distintos (Fig.10) y la expresión de *c-fos* y *c-jun* en respuesta a un estímulo es temporalmente distinta, la expresión de *c-jun* se mantiene hasta por 1 hora, mientras que el nivel del RNAm de *c-fos* baja rápidamente a partir de los 30 min.

Si embargo, no podemos descartar que las diferencias en los niveles de expresión de *c-fos* y *c-jun* se deban al menos en parte, a que la norepinefrina influye en la estabilidad del mensajero, ya que la expresión de un gen es el balance entre la transcripción y la degradación del mismo, lo que puede ser muy importante para la fisiología de la célula. Si recordamos, el papel transformante de *c-fos*, por dar un ejemplo, este es consecuencia de los dos parámetros, es decir, del nivel de expresión del RNAm y de su estabilidad (90). Para algunos genes se ha determinado que la estabilidad del mensajero es regulada por algunos agentes y hormonas, se ha visto que la expresión del proto-oncogene *c-fos* es estabilizada a nivel postranscripcional por la angiotensina II y por el PMA (131). Faltaría demostrar si los agentes adrenérgicos prolongan la vida media del mensajero, en particular la de *c-fos*. En principio, el tratamiento de las células con un inhibidor de la transcripción como lo es la actinomicina D, permitiría observar por ensayos de *run-off* en los que se determina directamente en núcleo la transcripción, un incremento aunque discreto en la síntesis del RNAm en respuesta al estímulo, lo que sugeriría que la regulación de la expresión del proto-oncogene por la hormona no ocurre sólo a nivel transcripcional. Si la vida media del mensajero es afectada por los agentes adrenérgicos podríamos comprobarlo mediante dos experimentos: 1) el tratamiento de las células con la actinomicina D, posterior al estímulo que se da a distintos tiempos, permitiría observar si el nivel del RNAm de alguno de los genes, en este caso el de *c-fos*, decae más lentamente cuando las células son estimuladas, con respecto al basal, sugiriendo entonces que existe una regulación del mensajero a nivel postranscripcional ocasionado por la hormona, y 2) el pre-tratamiento de las células con actinomicina D, antes de dar el estímulo por distintos tiempos, permitiría observar si igualmente el nivel del RNAm decae lentamente con respecto al basal cuando las células son estimuladas, sugiriendo que la hormona modula la estabilidad del RNAm a nivel postranscripcional, y además que, el efecto es independiente de la transcripción *de novo*. Si se tratara a las células con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en lugar de la hormona, probablemente como sucede en otros casos, el nivel de la transcripción a diferentes tiempos se mantendría en el mismo nivel, ya que al parecer las modificaciones postranscripcionales que estabilizan al mensajero son debidas a proteínas presentes en el repertorio de la célula.

Si esto fuera cierto, *c-fos* tendría una vida media más prolongada como respuesta a la norepinefrina y por ello las diferencias observadas entre la expresión de *c-fos* y *c-jun*.

Como ya mencioné anteriormente, los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* participan en fenómenos celulares tales como proliferación, diferenciación, muerte celular programada

(89, 90, 100, 101, 103 y 104); sin embargo, los mecanismos moleculares que emplean cada una de las señales extracelulares para inducir su expresión, no se ha estudiado todavía.

En la expresión de *c-fos* y *c-jun* participan cinasas que son clave en las vías de transducción, la PKC, la PKA, las JAKs, las cinasas de tirosina como Fyn, Lyn, etc. En este trabajo, nosotros observamos que la PKC participa en la expresión de *c-fos* y *c-jun* como respuesta a la activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, pero no conocemos los blancos de fosforilación. Se sabe que la PKC por un lado, fosforila a Raf-1 y la activa, pero también fosforila a factores como TCF y ATF2 (90) que inducen la transcripción de estos proto-oncogenes. Probablemente, la vía de transducción que se enciende y termina en la expresión de uno u otro, dependerá de la señal extracelular, considerando que igualmente importante es el sistema celular y la maquinaria celular con que este cuente.

Se ha sugerido que los caminos para la expresión de estos proto-oncogenes son distintos, dependiendo del receptor activado. Como parte de este trabajo, nosotros (88) al igual que otros grupos demostramos en distintos sistemas celulares que *c-fos* se expresa por la acción de los receptores  $\beta$ - y  $\alpha_1$ -adrenérgicos, receptores que emplean distintos elementos celulares para amplificar la señal extracelular; y *c-fos* y *c-jun* por la acción de los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  en fibroblastos; en adipocitos de tejido café la expresión de *c-fos* y *c-jun* se da como respuesta al estímulo  $\beta$  y  $\alpha_1$ , y este efecto es sinérgico, lo que sugiere que en este sistema participan al menos, dos vías de transducción, ya que por su parte los receptores  $\beta$  activan a la PKA y los  $\alpha_1$  a la PKC (85); en adipocitos de la línea celular ob1771 se demostró que la norepinefrina regula la expresión del gene de la lipasa de fosfolípidos por medio de una vía directamente relacionada con la expresión de *c-fos* y de la proteína correspondiente al gene de la lipasa (65). Otros trabajos, igualmente apoyan el hecho de que son vías distintas las que regulan la transcripción de los dos proto-oncogenes, se ha observado que los agentes que elevan el calcio intracelular como son los ionóforos de calcio estimulan la actividad de la MAPK, cinasa que participa en la señalización que lleva a la expresión de estos proto-oncogenes, mientras que agentes que elevan el nivel de AMPc no producen dicho efecto, sugiriendo que el control de la expresión se debe a varios elementos celulares (127). Otras hormonas que activan receptores acoplados al mismo sistema de transducción que los receptores  $\alpha_1$ , como son los receptores de la angiotensina II, ET-1, carbalcol y ácido fosfatídico (115, 116, 118, 119 y 125) también activan a la MAPK, pero son menos efectivos (127), algunos de ellos inducen la expresión de *c-fos* y *c-jun*.

De nuestros resultados podemos concluir que en la expresión *c-fos* y *c-jun* inducida por la activación de receptores  $\alpha_1$  participa la PKC ya que tanto, la *down regulation* de la PKC por el pretratamiento prolongado de las células con TPA 1 $\mu$ M como el tratamiento con inhibidores específicos de la PKC, abaten la respuesta de la norepinefrina. Sin embargo, no queda definido cuál(es) de la(s) tres isoformas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  formas sensibles al PMA, presentes en las células Rat-1(123) participan directamente en la expresión de *c-fos* y *c-jun* inducida por los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ , ya que las tres isoformas desaparecen en el extrato de proteína por la *down regulation*, aunque en distinta magnitud, e igualmente las tres isoformas se translocan a la membrana en respuesta a

norepinefrina (manuscrito 2). Creemos que sería importante definir cuál o cuáles participa(n) directamente en la expresión de *c-fos* y *c-jun*, ya que fisiológicamente podría ser relevante. Se ha observado que cada una de las isoformas, si bien son similares en estructura, estas son reguladas diferencialmente por los cofactores (25, 26, 27, 28 y 29) en distintos sistemas celulares, y por estudios recientes se les asocia a cada una de ellas con funciones celulares particulares. Así por ejemplo, se analiza el papel de las isoformas  $\alpha$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  de la PKC de linfocitos T y se les asocia con la activación de las células. Los resultados del trabajo demuestran que las isoformas  $\epsilon$  y  $\alpha$ , pero no la  $\zeta$ , pueden regular el factor de transcripción AP-1, y el factor nuclear NF-AT1 (NF-AT1 del inglés: nuclear factor of activated T cells), pero sólo PKC  $\epsilon$  regula la actividad del factor NF-kB, mientras que PKC  $\alpha$  y Ras activa, no lo hacen, resultados que demuestran que PKC  $\alpha$ , p21Ras y PKC  $\epsilon$  no forman parte de la misma vía de transducción que induce la activación de células T (132). Por otra parte en células cardíacas, las isoformas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  muestran distintas especificidades para fosforilar las subunidades de la troponina inhibidora de la ATPasa de calcio y la troponina de unión al calcio, cada isoforma muestra diferencias en afinidad por el reconocimiento de los sitios de fosforilación de dichas subunidades, incluso la isoforma  $\zeta$  que no es activada por ésteres de forbol y calcio. La fosforilación de la subunidad inhibidora por PKC  $\delta$  es la única capaz de mimetizar la fosforilación por PKA en las serinas 23 y 24, que resulta en la disminución de la sensibilidad al calcio de la Mg-ATPasa, y PKC  $\zeta$  es la única capaz de fosforilar selectivamente los sitios spt 8 y 9 de dicha subunidad, lo que ocasiona un incremento en la afinidad por el calcio (133). En otro trabajo reportan que la PKC  $\alpha$  tiene un papel fundamental en la proliferación celular de fibroblastos Swiss 3T3 (134). De las isoformas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\beta$  de células cebadas de rata, sólo PKC  $\beta$  (isoforma dependiente de calcio) y PKC  $\epsilon$  (isoforma independiente de calcio) participan en la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* en respuesta a la activación del receptor de IgE (135).

Así mismo, la translocación de las diferentes isoformas de PKC parece ser importante ya que esta es específica de las señales extracelulares. La PKC  $\epsilon$  migra a la membrana plasmática y PKC  $\zeta$  a la región perinuclear en respuesta a la fenilefrina, un agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico. Se presume que la PKC  $\epsilon$  tiene relación directa con la contracción independiente de calcio y la PKC  $\zeta$  (presente en células de la vena porta) con la contracción dependiente de calcio. Comentan los autores que la translocación intranuclear de PKC  $\zeta$  puede ser un mensaje iniciado por el agonista para respuestas a largo plazo, como la expresión de genes y la proliferación celular, esto lo fundamentan en que la síntesis de DNA se afecta por la activación de elementos que responden a suero, asociado con la transcripción de genes de inducción temprana (31).

Finalmente, una de las preguntas que surgen de este estudio es ¿Cuál es el significado de que los proto-oncogenes se expresen o no diferencialmente en respuesta al receptor activado?. El que se expresen determinados proto-oncogenes en respuesta a la activación de un receptor es específica, no todos los receptores, aún acoplados al mismo sistema de transducción tienen la capacidad de estimular la transcripción de genes de inducción temprana. Algunas hormonas como la angiotensina II, la ET-1, el carbacol, el ácido

fosfatídico activan a la MAPK, considerado un paso previo en la expresión de los proto-oncogenes *fos* y *jun*, sin embargo, esta activación es diferente en magnitud y no se ha demostrado que todos tengan la capacidad de inducir su expresión. Por otra parte, si se traducen a proteínas los proto-oncogenes expresados, podríamos inferir que dicha expresión es relevante para la célula. Se sabe en primer lugar que, hay un orden en la estabilidad de los dímeros que constituyen al factor AP-1, Fos-Fos < Jun-Jun < Fos-Jun, y en segundo que, en la inducción o represión de los genes es determinante el que AP-1 esté conformado por unas proteínas y no por otras, es decir, se ha demostrado que la expresión rápida y transitoria de Fos se relaciona invariablemente con la proliferación, sin embargo, podemos pensar que además se requiere de la expresión de Jun ya que el dímero Fos-Fos es el más inestable, se sabe que específicamente el dímero Fos-Jun inhibe la transcripción de Fos, del gene del factor atrial natriurético o que actúa como un potente activador de la transcripción del gene de la metalotionina IIA, colagenasa, colágena  $\alpha 1$ (III), tensina, proencefalina y genes SV40; que Fos y FosB se requieren durante la transición de la fase G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub>, mientras que Fra1 y Fra2 se requieren en el crecimiento asincrónico de las células; probablemente Fos, FosB y Fra1 y Jun, JunB y JunD tengan cada proteína una función distinta durante el desarrollo, ya que se expresan diferencialmente durante el desarrollo y en tejidos de adultos; el RNAm de dFra es restringido durante el desarrollo del embrión de la *Drosophila* y el dFra se expresa uniformemente (90). Todo ello nos habla de la importancia que tiene que se exprese uno, y no otro proto-oncogene en respuesta a un estímulo específico.

Algunas de las perspectivas del presente estudio son determinar si los proto-oncogenes expresados en respuesta a norepinefrina se traducen a proteína, de manera que se pueda considerar que su expresión es relevante para la célula; definir si alguna de las isoformas de la PKC convencionales y/o no convencionales, tiene un papel significativo en la inducción de la expresión de uno u otro proto-oncogene por la estimulación adrenérgica, y por otro lado, profundizar en la descripción de la vía de transducción de la expresión de *fos* y *jun* inducida por receptores  $\alpha_1$ ; determinar cuál es la región reguladora del promotor de *c-jun* que responde a los adrenérgicos. El sitio más lógico que participa en la inducción del promotor de *fos* por diversos agentes es SRE (136), sin embargo, la acción  $\alpha_1$ -adrenérgica activa también el sitio Sp1, y se activan además, las cajas M-CAT y CArG que se requieren en la inducción del promotor del gene de la  $\alpha$ -actina durante la hipertrofia de miocitos cardíacos (77).

**BIBLIOGRAFIA**

1. Lenhinger, A., Nelson, D. L. y Cox, M. M. (1992) Principles of Biochemistry. Segunda edición. Editorial Worth, Cap.22. Integration and hormonal regulation of mammalian metabolism. 736-785 p.
2. Weigel, N.L. (1996) Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.*; 319:657-667.
3. Cooke, B.A., King, R. J. B. y vander Molen, H. J. (1988) Hormones and their actions. Part I. Edit. Elsevier, Sci. Publishers, B. V. (Biomedical Div.) P. O. (Box 211) 1000 AE Amsterdam The Netherlands.
4. Jans, D. A. (1994) Nuclear signaling pathways for polypeptide ligands and their membrane receptors?. *FASEB*; 8: 841-847.
5. Gilman, A. G. (1987) G: proteins transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.*; 56: 615-649.
6. Spiegel, M. (1995) G protein gene knockout hits the gut. *Nature Medicine*; 1(6):522-524.
7. Kleuss, Ch., Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G. y Wittig, B. (1993) Selectivity in signal transduction determined by  $\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins. *Science*; 259:832-834.
8. Kleuss, C., Hescheler, J., Ewel, C., Rosenthal, W., Schutlz, G. y Wittig, B. (1991) Assignment of G protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature*; 353: 43-48.
9. Carozzi, A. C., Camps, M., Gierschik, P. y Parker, P. (1993) Activation of phosphatidylinositol lipid-specific phospholipase C- $\beta$ 3 by G-protein  $\beta$  subunits. *FEBS*; 315(3): 340-342.
10. Luttrell, L. M., Hawes, B. E., van Biensen, T., Luttrell, D. K., Lansing, T. J. y Lefkowitz, R. J. (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and G  $\beta$  subunits-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*; 271: 9443-9450.
11. Tang, W-J. y Gilman, A. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein  $\beta$  subunits. *Science*; 254: 1500-1503.
12. Yamada, M., Jahangir, A., Hosoya, Y., Inanobe, A., Katada, T. y Kurachi, Y. (1993) G $\alpha$  and brain G $\beta$  activate muscarinic K<sup>+</sup> channel through the same mechanism. *J. Biol. Chem.*; 268: 24551-24554.
13. Blanck, J. L., Brattain, K. A. y Exton, J. H. (1992) Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein  $\beta$  subunits. *J. Biol. Chem.*; 267: 23069-23075.

14. Kleuss, Scherüb, H., Hescheler, J., Schultz, G. y Wittig, B. (1992) Different  $\beta$ -subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature*; 358: 424-426.
15. Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iñíguez- Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G. y Sprang, S. R. (1995) The structure of the G protein heterotrimeric  $G_{i\alpha 1}\beta 1\gamma 2$ . *Cell*; 83: 1047-1058.
16. Fields, T. A. y Casey, P. J. (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem. J.*; 321: 561-571.
17. Liebmann, C., Grane, A., Boehmer, A., Koralenko, M., Adomeit, A., Steinmetzer, T., Nürnberg, B., Wetzer, R. y Boehmer, F.-D. (1996) Tyrosine phosphorylation of  $G_{s\alpha}$  and inhibition of bradykinin-induced activation of the cyclic AMP pathway in A431 cells by epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*; 271: 31098-31105.
18. Tang, W.-J. y Gilman, A. G. (1992) Adenylyl cyclases. *Cell*; 70: 869-872.
19. Powis, G. (1991) Signalling targets for anticancer drug development. *TIPS*; 12:188-194
20. Catt, K. J., Hunyady, L. y Bulla, T. (1991) Second messengers derived from inositol lipids. *J. of Bioenergetics and Biomembranes*; 23(1): 7-27.
21. Berridge, M. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*; 361: 315-325.
22. Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*; 258: 607-613.
23. Denhardt, D. T. (1996) Signal-transducing phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.*; 318: 729-747.
24. Nelsestuen, G. L. y Bazzi, M. D. (1991) Activation and regulation of protein kinase C enzymes. *J. of Bioenergetics and Biomembranes*; 23(1): 43-61.
25. Hug, H. y Sarre, T. F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?. *Biochem. J.*; 291: 329-343.
26. Dennis, E. A., Rhee, S.-G., Billah, M. M. y Hannunn, Y. A. (1991) Role o phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB*; 5: 2068-2077.
27. Pears, C. J. y Parker, P. (1991) Domain interactions in protein kinase C. *J. of Cell. Sci.* 100: 683-686.
28. Schmitz-Peiffer, C., Browne, C. L. y Biden, T. J. (1996) Characterization of two forms of protein kinase  $\alpha$ , with different substrate specificities, from skeletal muscle. *Biochem. J.*; 320: 207-214.
29. Malviya, A. N. y Block, C. (1993) Nuclear protein kinase C and signal transduction. *Receptor*; 3: 257-275.



30. Robles-Flores, M. y García-Sáinz, J. A. (1993) Activated protein kinase C binds to intracellular receptors in rat hepatocytes. *Biochem. J.*; 296: 467-472.
31. Khalil, R. A., Lajoie, Ch., Resnick, M. S. y Morgan, K. G. (1992)  $Ca^{2+}$ -independent isoforms of protein kinase C differentially translocate in smooth muscle. *J. Physiol.*; 263 (cell physiol.) 32: C714-C719.
32. Malarkey, K., Belham, C. M., Paul, A., McLees, A. y Scott, P. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled-receptors. *Biochem. J.*; 309: 361-375.
33. White, M. F. (1991) Structure and function of tyrosine kinase receptors. *J. of Bioenergetics and Biomembranes*; 23(1): 63-82.
34. Therrien, M., Chang, H. C., Solomon, N. M., Karin, F. D., Wassarman, D. A. y Rubin, G. M. (1995) KSR, a novel protein kinase required for Ras signal transduction. *Cell*; 83: 879-888.
35. Burgering, B. M. Th., Pronk, G. J., van Weeren, P. C., Chardin, P. y Bos, J. L. (1993) cAMP antagonizes  $p21^{ras}$ -directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSOS nucleotide exchange factor. *EMBO. J.* 4211-4220.
36. Chao, R., Khan, W. y Hannun, Y. (1992) Retinoblastoma protein dephosphorylation induced by D-erythro-sphingosine. *J. Biol. Chem.* 267: 23459-23462.
37. Milligan, G. (1993) Mechanisms of multifunctional signalling by G protein-linked receptors. *TIPS*; 14: 239-244.
38. Houslay, M. D. (1991) "Crosstalk": a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem.*; 195: 9-27.
39. Ballou, L. R., Lauderkind, S. J. F. y Raghov, R. (1996) Ceramide signalling and the immune response. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1301: 273-287.
40. Lee, J. Y., Hannun, Y. A. y Obeid, L. M. (1996) Ceramide inactivates cellular protein kinase C  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*; 271: 13169-13174.
41. Chuang, T. T., LeVine III, H. y De Blasi, A. (1995) Phosphorylation and activation of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*; 270: 18660-18665.
42. Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E. y Lohse, M. J. (1996) Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*; 93: 2105-2109.
43. García-Sáinz, J. A. (1995) Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. *Archives of Medical Research*; 26(3): 205-212.
44. Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R. J. y Caron, M. G. (1991) Molecular biology of adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. *Bioch. Biophys. Acta*; 1095: 127-139.
45. Ahlquist, R. P. (1948) A study of the adrenergic receptors. *Am. J. Phys.*; 153: 583-600.

46. Lands, A. M., Arnold, A., McAulliff, J. P., Luduena, F. P. y Brown, J. T. G. (1967) Differentiation of receptors systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*; 214: 597.
47. Hieble, J. P. y Bond, R. A. (1994) New directions in adrenoceptor pharmacology. *TIPS*; 15: 397-399.
48. Langer, S. Z. (1979) Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmembrane release. *Br. J. Pharmacol.*; 60: 481.
49. Berthelsen, S. y Pettinger, W. A. (1977) A functional basis for the classification of  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Life Sci.*; 21: 595.
50. Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Hieble, J. P., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Molinoff, P. B., Ruffolo, R. JR. y Trendelenburg, U. (1994) IV International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.*; 46: 121.
51. Ford, A. P. D. W., Williams, T. J., Blue, D. R. y Clarkem, D. E. (1994)  $\alpha_1$ -adrenoceptors classification: sharpening Occam's razor. *TIPS*; 15: 167-170.
52. Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. y Kobilka, B. K. (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster  $\alpha_1$ -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 85: 7159-7163.
53. Gao, B., Kunos, G. (1993) Isolation and characterization of the gene encoding the rat  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor. *Gene*; 181: 243-247.
54. Schwinn, D. A., Page, S. O., Middleton, J. P., Lorenz, W., Liggett, S., Yamamoto, K., Lapetina, E. G., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. y Cotecchia, S. (1991) The  $\alpha_{1c}$ -adrenoceptor: characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity. *Mol. Pharmacol.*; 40: 619-626.
55. Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W.-Y., Schwinn, D. A., Yang-Feng, T. L., Brownstein, M., Lefkowitz, R. J. y Caron, M. G. (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA for the  $\alpha_{1a}$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*; 266: 6365-6369.
56. Pérez, D. M., Piascik, M. T., Graham, R. M. (1991) Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an  $\alpha_{1d}$  adrenergic receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.*; 40: 876-883.
57. Schwinn, D. A. y Lomasney, J. W. (1992) Pharmacology characterization of cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggest the existence of a fourth subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*; 227: 433-436.
58. Kenny, B. A., Naylor, A. M., Greengrass, P.M., Russell, M. T., Friend, S. T., Read, A. M. y Wyllie, M. G. (1994) Pharmacology properties of the cloned  $\alpha_{1a/d}$ -adrenoceptor subtype are consistent with the  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptor characterized in rat cerebral cortex and vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*; 111: 1003-1008.

59. Piascik, M. T., Smith, M. S., Soltis, E. E. y Pérez, D. M. (1994) Identification of the mRNA for the novel  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor and two other  $\alpha_1$ -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Mol. Pharmacol.*; 46: 30-40.
60. Blanck, J. L., Ross, A. H. y Exton, J. H. (1991) Purification and characterization of two G-proteins that activate the  $\beta_1$  isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.*; 266: 18206-18216.
61. Wu, D., Katz, A., Lee, Ch-H. y Simon, M. Y. (1992) Activation of phospholipase C by  $\alpha_1$ -adrenergic receptors is mediated by the  $\alpha$  subunits of Gq family. *J. Biol. Chem.*; 267: 25798-25802.
62. Wu, D., Jiang, H. y Simon, M. Y. (1995) Different  $\alpha_1$ -adrenergic receptors sequences required for activating different G  $\alpha$  subunits of Gq class of G proteins. *J. Biol. Chem.*; 270: 9828-9832.
63. Knowlton, K. U., Michel, M. C., Itani, M., Shubeita, H., Ishihara, K., Brown, J. H. y Chien, K. R. (1993) The  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 268(21):15373-15380.
64. Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J. J. e Ibarra, M. (1997)  $\alpha_{1d}$  and  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery. *Eur. J. of Pharmacol.*; 322: 225-227.
65. Pérez, D. M., DeYoung, M. B. y Graham, R. M. (1993) Coupling of expressed  $\alpha_{1b}$ - and  $\alpha_{1d}$ -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol. Pharmacol.*; 44: 784-795.
66. Allen, L. F., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. y Cotecchia, S. (1991) G protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 88: 11354-11358.
67. Cotecchia, S., Ostrowski, J., Kjelsberg, M. A., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1992) Discrete amino acid sequences of the coupling to phosphatidylinositol hidrolisis. *J. Biol. Chem.*; 267: 1633-1639.
68. Diviani, D., Lattio, A-L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J. L. y Cotecchia, S. (1996) Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensibilization of the  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*; 271: 5949-5058.
69. Lattion, A-L., Diviani, D. y Cotecchia, S. (1994) Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensibilization of the  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*; 269: 22887-22893.
70. Vázquez-Prado, J. y García-Sáinz, J. A. (1996) Effect of phorbol myristate acetate on  $\alpha_1$ -adrenergic action in cells expressing recombinant  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.*; 50: 17-22.

71. Kruijger, W., Skely, H., Botteri, F., van der Putten, H., Barber, J. R., Verma, Y. M. y Leffert, H. J. (1986) Proto-oncogene expression in regeneration liver is stimulated in cultures of primary adult rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*; 261: 7929-7933.
72. Shertline, P. y Mascardo, R. (1984) Cathecolamines are mitogenic in 3T3 and bovine aortic endothelial cells. *J. Clin. Invest* 74: 483-487.
73. Cruise, J. L., Houck, K. A. y Michaelopoulos, M. (1985) Induction of DNA synthesis in cultures rat hepatocytes through stimulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors by norepinephrine. *Science*; 227: 749-751.
74. Chin, J. H. (1996) Activation of heat shock protein (hsp 70) and proto-oncogene expression by alpha 1 adrenergic agonist in rat aorta with age. *J. Clin. Invest.*; 97(10): 2316-2323.
75. Zimmer, H. G., Kolbek-Ruhmkorff, C. y Zierhut, W. (1995) Cardiac hypertrophy induced by alpha- and beta-adrenergic receptor stimulation. *Cardioscience*; 6(1): 47-57.
76. Kussela, P., Rehnmark, S., Jacobsson, A., Cannon, B. y Nedergaard, J. (1997) Adrenergic stimulation of lipoprotein lipase gene expression in rat brown adipocytes differentiated in culture: mediation via  $\beta_3$ - and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. *Biochem. J.*; 321: 759-767.
77. Karns, L. R., Kariya, K. y Simpson, P. C. (1995) M-CAT, CaRG, and Sp-1 elements are required for  $\alpha_1$ -adrenergic induction of the skeletal  $\alpha$ -actin promoter during cardiac myocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.*; 270: 410-417.
78. Kariya, K., Farrance, Y. K. G. y Simpson, P. C. (1993) Transcriptional enhancer factor-1 in cardiac myocytes interacts with an  $\alpha_1$ -adrenergic- and  $\beta$ -protein kinase C-inducible element in the rat  $\beta$ -myosin heavy chain promoter. *J. Biol. Chem.*; 268: 26658-26662.
79. Mertz, P. M., Pox, P. C., Pluta, A., Baum, B. J. y Kousvelari, E. E. (1992) Effects of ionizing radiation and beta-adrenergic-stimulation on the expression of early response genes in rat parotid glands. *Radiat. Res.*; 130(1): 104-112.
80. Mertz, B. M., Bacman, T., Bernards, A. y Kousvelari, E. (1990) Two novel *c-abl* mRNAs are expressed in rat parotid salivary glands during in vivo beta-adrenergic receptor stimulation. *Biochim. Biophys. Acta*; 1049(3): 272-277.
81. Chin-Ko, Y., Ambudkar, Y. S. y Kousvelari, E. (1992) Differential expression of early response genes, *c-jun*, *c-fos* and *jun B* in A5 cells. *Am. J. Physiol.*; 263(Gastrointest. Liver Physiol.) 26: G934-G938.
82. Barka, T., van-der Noen, H. y Gresik, E. W. (1989) Adrenergic regulation of *c-fos* expression in cultured BC3H1 muscle cells. *Exp. Cell. Res.*; 185(2): 419-435.
83. Iwaki, K., Sukhatme, V. P., Shubeita, H. E. y Chien, K. (1990)  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. *J. Biol. Chem.*; 265(22): 13809-13816.

84. Brand, T., Sharma, H. S. y Shaper, W. (1993) Expression of nuclear proto-oncogenes in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*; 25: 1325-1337.
85. Thonberg, H., Zhang, S.-J., Tvrdik, P., Jacobsson, A. y Nedergaard, J. (1994) Norepinephrine utilizes  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptors synergistically to maximally induce *c-fos* expression in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.*; 269(52): 33179-33186.
86. Hsu, J. C., Bravo, R. y Taub, R. (1992) Interaction among LRF-1, *junB*, *c-jun* y *c-fos* define regulatory program in the G1 phase of liver regeneration. *Mol. Cell. Biol.*; 12: 4654-4665.
87. Porsh-Hällstrom, Y., Blanck, A., Eriksson, L. C. y Gustafsson, J. A. (1989) Expression of the *c-myc*, *c-fos* and *c-rasHa* proto-oncogenes during sex-differentiated rat liver carcinogenesis in the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis*; 10: 1793-1800.
88. García-Sáinz, J. A. y Alcántara-Hernández, R. (1996)  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptor activation increases *c-fos* expression in isolated guinea pig hepatocytes. *Pharmacol. Commun.*; 7: 107-113.
89. Morgan, J. I. y Curran, T. (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Ann. Rev. Neurosci.*; 14: 421-451.
90. Hesketh, R. (1994) *The oncogene handbook*. Editores: Harcourt Brace, Academ. Press. INC. San Diego, CA 9201, USA. 178-199 y 236-252 pp.
91. Edwards, D. R. (1994) Cell signalling and the control of gene transcription. *TIPS*; 15: 239-244.
92. Hunter, T. (1997) Oncoprotein networks. *Cell*; 88: 333-346.
93. Karin, M. y Smeal, T. (1992) Control of transcription factors by signal transduction pathways; the beginning of the end. *TIBS*; 17: 418-422.
94. Mitchell, P. J. y Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*; 245: 371-378.
95. Curran, T. y Franza, R. Jr. (1988) Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*; 55: 395-397.
96. Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*; 270: 16483-16486.
97. Auwerx, J. y Sassone-Corsi, P. (1991) IP-1: a dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell*; 64: 983-993.
98. Berger, A., Rosenthal, D. y Spiegel, S. (1995) Sphingosylphosphocholine, a signaling molecule wich accumulates in Niemann-Pick-disease type A, stimulates DNA-binding activity of the transcription activator protein AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 92: 5885-5889.

99. Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P. y Wagner, E. F. (1995) Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.*; 14(21): 5338-5349.
100. Saez, E., Ruberg, S. E., Muller, E., Oppenheim, H., Smoluk, J., Yuspa, S. H. y Spiegelman, B. M. (1995) *c-fos* is required for malignant progression of skin tumors. *Cell*; 82: 721-732.
101. Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N. y Wagner, E. F. (1993) *c-Jun* is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*; 365: 179-181.
102. Aragónés, J., López-Rodríguez, C., Corbi, A., Gómez del Arco, D., López-Cabrera, M., de Landazuri, M. O. y Redondo J.M. (1996) Dithiocarbamates trigger differentiation and induction of *CD11C* gene through AP-1 in the myeloid lineage. *J. Biol. Chem.*; 271: 10924-10931.
103. Sikora, E., Grassilli, E., Ballestra, E., Troiano, L. y Franceschi, C. (1993) Studies of the relationship between cell proliferation and cell death. III. AP-1 DNA-binding activity during concanavalin A-induced proliferation or dexamethasone induce apoptosis of rat thymocytes. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*; 192(2): 386-391.
104. Nagatsu, T. (1995) Tyrosine hydroxylase human isoforms structure and regulation in physiology and pathology. *Essays. Biochem.*; 30: 15:35.
105. Pages, G., Stanley, E. R., LeGall, M., Brunet, A. Y., Pouyssegur, J. (1995) The mouse p44 mitogenic activated protein kinase (extracellular signal regulated kinase-1) gene. Genomic organization and structure of the 5'-flanking regulatory region. *J. Biol. Chem.*; 270: 26986-26992.
106. Niemann, G., van-Besser, H. y Walter, R.D (1996) *Panagrellus redivivus* ornithine decarboxylase: structure of the gene, expression in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant protein. *Biochem. J.*; 317(pt.1): 135-140.
107. Roze-Heusse, A. Houbinguian, M. L., Debacker, C., Zakin, M. M. y Duchange, N. (1996) Metallothionein gene expression in melanoma cells is correlated with high levels of Jun/Fos family transcripts and the presence of a specific AP1-dependent ternary complex. *Biochem. J.*; 318(pte.3): 83-88.
108. Gum, R., Lengyel, E., Juárez, J., Chen, H., Sato, H., Seiki, M. y Boyd, D. (1996) Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras in mitogen-activated protein kinase kinase-1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEAD 3/ets and AP-1 sequences. *J. Biol. Chem.*; 271: 10672-10680.
109. Vandent, F. M., van Wijnen, A. J., Last, T. J., Bortell, R., Stein, J. L., Lian, J.B. y Stein, G. S. (1995) Concerted control of multiple histone promoter factors during cell density inhibition of proliferation in osteosarcoma cells: reciprocal regulation of cell cycle controlled and bone-related genes. *Cancer Res.*; 53(10): 2399-21409.
110. Wyke, A. W., Lang, A. y Frame, M. C. (1996) Uncoupling of the pathway with link MAP kinase to *c-fos* transcription and AP-1 in response to growth stimuli. *Cell. Signal.*; 8(2): 131-139.

111. Laeman, D., Whischarody, S., Flickinger, T. W., Commane, M. A., Kerr, I. M., Levy, D. E. y Stark, G. R. (1996) Roles of JAKS in activation of STATs and stimulation of *c-fos* gene expression by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.*; 16(1): 369-375.
112. Cook, S. y McCormick, F. (1994) Ras blooms on sterile ground. *Nature*; 369: 361-362.
113. Crespo, P., Xe, N., Simond, W. I. y Gutkind, J. S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein  $\beta$  subunits. *Nature*; 369: 418-420.
114. Muldoon, L. L., Rodland, K. D., Forsythe, M. L. y Magun, B. E. (1989) Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, diacylglycerol release, and gene expression in response to endothelin, a potent new agonist for fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*; 264: 8529-8536.
115. Chuprun, J. K., Raymond, J. R y Blakshear, P. J. (1997) The heterotrimeric G protein  $G_{\alpha i 2}$  mediates lysophosphatidic acid-stimulated induction of the *c-fos* gene in mouse fibroblast. *J. Biol. Chem.*; 272(2): 773-781.
116. Berry, N. y Friend, S. (1969) High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.*; 43: 506-520.
117. Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.*; 162: 156-159.
118. González-Espinosa, C. y García-Sáinz, J. A. (1992) Angiotensin II and active phorbol esters induce protooncogene expression in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*; 1136: 309-314.
119. González-Espinosa, C. y García-Sáinz, J. A. (1995) Protein kinase and phosphatases modulate *c-fos* expression in rat hepatocytes. Effects of angiotensin II and phorbol myristate acetate. *Life Sci.*; 56: 723-728.
120. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual Second edition. Cold, Spring Harbor laboratory Press. USA. (Tomo I).
121. Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R. y García-Sáinz, J. A. (1991) Differences in phorbol ester-induced decrease of the activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes. *Bioch. Biophys. Acta*; 1094: 77-84.
122. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*; 193: 265-275.
123. Berti, L., Musthaf, L., Kroder, G., Kellerer, M., Tippmer, S., Mushack, J., Seffer, E., Seedor, K. y Häring, H (1994) Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in Rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*; 269: 3381-3386.
124. Gutiérrez-Venegas, G. y García-Sáinz, J. A. (1993) Characterization of the  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptors of chicken hepatocytes. Signal transduction and actions. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C(3):797-803.

125. García-Sáinz, J. A., Reyes-Olivares, J. A., Macías-Silva, M. y Villalobos-Molina, R. (1995) Characterization of the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors of catfish hepatocytes: functional and binding studies. *General and Comparative Endocrinology*; 97: 111-120.
126. García-Sáinz, J. A., Casas-González, P., Romero-Avila, M. T. y González-Espinosa, C. (1994) Characterization of the hepatic  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Sci.*; 54(25): 1995-2003.
127. García-Sáinz, J. A., Romero-Avila, M. T. y González-Espinosa, C. (1996) Coexpression of  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors in the liver of the rhesus monkey (*Macaca mulata*) *Eur. J. of Pharmacol.*; 311: 277-283.
128. García-Sáinz, J. A., Romero Avila, MT y Tórres Márquez, ME (1995). Characterization of the human liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors. Predominance of the  $\alpha_{1A}$  subtype. *Eur. J. Pharmacol* 289:81-86.
129. García-Sáinz, J. A. y Macías-Silva, M. (1995) Species heterogeneity of liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors. Subtypes, signal transduction and regulation. *Pharmacol. Commun*; 6(1-3):53-60.
130. Theroux, T. L., Esbenshade, T.A., Peavy, R. D. y Minneman, K. P. (1996) Coupling efficiencies of human  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. *Mol. Pharmacol.*; 50: 1376-1387.
131. González-Espinosa, C. y García-Sáinz, J. A. (1996) Hormonal modulation of *c-fos* expression in isolated hepatocytes. Effects of angiotensin II and phorbol myristate acetate on transcription and mRNA degradation. *Bioch. Biophys. Acta*; 1310: 217-222.
132. Genot, E. M., Parker, P. J. y Cantrell, D. A. (1995) Analysis of the role of protein kinase C- $\alpha$ , - $\epsilon$  y - $\zeta$  in T cell activation. *J. Biol. Chem.*; 270: 9833-9839.
133. Jideama, M.N., Noland, T. A., Raynor, R. L. J., Blobe, G. C., Fabbro, D., Kazanietz, M. G., Blumberg, P.M., Hannun, Y. A. y Kuo, J. F. (1996) Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *J. Biol. Chem.*; 271: 23277-23283.
134. Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Meinardi, E. y Calle, R. (1996) Diversity of roles of protein kinase C  $\alpha$  in the proliferation of Swiss 3T3 cells. *Biochem. J.*; 315: 513-516.
135. Razin, E., Szallasi, Z., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M. y Rivera, J. (1994) Protein kinase C- $\beta$  and C- $\epsilon$  link the mast cell high affinity receptor for IgE to the expression of *c-fos* and *c-jun*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 91: 772-7726.
136. Shaw, P. E. (1992) Ternary complex formation over the *c-fos* serum response element: p62<sup>TCF</sup> exhibits dual component specificity with contacts to DNA and an extended structure in the DNA-binding domain of p67<sup>SRF</sup>. *EMBO J.*; 11(8): 3011-3019.