



Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
del Colegio de Ciencias y Humanidades

8
2ej.

MODULACION DE LAS ACCIONES DEL GLUCAGON POR LOS ESTERES DE FORBOL

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(BIOQUIMICA)
PRESENTA LA BIOLOGA
MARINA MACIAS SILVA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

| | Pag. |
|----------------------------|------|
| INTRODUCCION | 6 |
| OBJETIVOS | 30 |
| MATERIALES Y METODOS | 31 |
| RESULTADOS | 32 |
| DISCUSION | 35 |
| BIBLIOGRAFIA | 48 |

MODULACION DE LAS ACCIONES DEL GLUCAGON POR LOS ESTERES DE FORBOL.

(RESUMEN)

La activación de la adenilato ciclasa (incremento de AMP cíclico), el aumento de la concentración del calcio citosólico y la estimulación del metabolismo hepático (ureogénesis, glucogenólisis y síntesis de citrulina) son algunas de las acciones que el glucagon ejerce en el hígado. Estas acciones que tiene la hormona son disminuidas por activadores de la proteína cinasa C, tales como vasopresina y los ésteres de forbol.

El H-7 un potente inhibidor de la proteína cinasa C disminuye marcadamente los efectos que los activadores de la proteína cinasa C, vasopresina y el forbol miristato acetato, tienen sobre las acciones del glucagon, estableciendo claramente la participación de la proteína cinasa C en la regulación de la transducción de la señal hormonal.

Los activadores de la proteína cinasa C tienen un mismo efecto sobre algunas de las acciones que ejerce el glucagon en el metabolismo hepático de ratas hipotiroideas y en el de las ratas normales, como son la estimulación de la acumulación de AMPc y de la producción de glucosa. Sin embargo se observó que la estimulación por el glucagon del incremento en la concentración de calcio citosólica y del metabolismo mitocondrial (evaluado tomando como parámetros la síntesis de urea y de citrulina), son disminuidos por los ésteres de forbol en una mayor proporción en las ratas hipotiroideas con respecto a las normales.

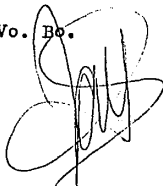
Los resultados obtenidos sugieren que la activación fisiológica de la proteína cinasa C por vasopresina o su activación farmacológica por el forbol miristato acetato altera las acciones del glucagon por lo menos a dos niveles: (i) la producción de AMP cíclico y (ii) la elevación de la concentración de calcio citosólico. Además se observa que las células de las ratas

hipotiroideas son más sensibles a las acciones de los ésteres de forbol.

Con respecto a la modulación del sistema de transducción de la adenilato cilasa, la activación de la proteína cinasa C induce una alteración en la activación de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Los resultados obtenidos parecen indicar que se induce una alteración en el estado funcional de la proteína fijadora de nucleótidos de guanina (Gs) sin observarse cambios en la cantidad de este componente. Además dicha alteración no parece ser causada por una fosforilación de Gs.

En cuanto a la alteración que induce la proteína cinasa C sobre la acumulación de calcio citosólico, aún no hemos explorado el mecanismo a través del cual se produce este efecto.

Vo. Bo.



Marina Macías Silva

Biol. Marina Macías Silva

TESISTA

Dr. J. Adolfo García Sáinz

ASESOR

INTRODUCCION

En la actualidad, la comunicación celular es una de las áreas más interesantes dentro del estudio de la fisiología de los seres vivos. En los organismos superiores existen dos principales sistemas de comunicación entre las células, estos son: el sistema nervioso y el sistema endócrino. Parte de estos sistemas funcionan de manera coordinada e integrada en el llamado sistema neuroendócrino.

La comunicación endócrina entre las células consiste básicamente en la liberación de un mensajero químico por un grupo de células y en la recepción de ese mensajero por las células que constituyen los tejidos blanco. Estas últimas células deberán tener la capacidad de recibir el mensaje, de interpretarlo y de responder a él; esta respuesta se ve reflejada normalmente en un cambio en el estado fisiológico de la célula.

La captación del mensaje depende de que las células posean receptores capaces de reconocer y unir al mensajero químico. Estos receptores son proteínas que pueden encontrarse en la membrana plasmática o en el interior de la célula y la estructura química que poseen les permitirá unir selectivamente a los mensajeros químicos.

Los mensajeros químicos pueden ser péptidos, como el glucagon, la vasopresina y la angiotensina; lípidos, como los glucocorticoides y otros esteroides; aminas, como adrenalina, noradrenalina y dopamina; o bien aminoácidos o alguno de sus derivados como la glicina, el ácido gama-amino butírico (GABA) y las hormonas tiroideas, entre otros.

Estos mensajeros pueden ser divididos con base en su naturaleza química en hidrofílicos e hidrofóbicos. Los mensajeros hidrofílicos como las catecolaminas, los aminoácidos y los péptidos son los que se unen a los receptores que se encuentran en la membrana plasmática; mientras que los mensajeros hidrofóbicos, como los esteroides, tienen la facultad de atravesar la membrana celular y de poder unirse a los receptores que se encuentran en el citoplasma. Esta unión que se establece entre el receptor y el mensajero es la responsable de la activación de un sistema de transducción que permite la transmisión de señales externas al interior celular.

Son varios los sistemas de transducción de las señales hormonales, que se han descrito a la fecha. En general estos sistemas se localizan en la membrana plasmática y constan de tres componentes principales: un receptor, una proteína acopladora fijadora de nucleótidos de guanina y un efector.

En el siguiente cuadro se presenta un esquema general del flujo de información que se establece a través de los sistemas de transducción dependientes de proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina (proteínas G).

| Entrada | | Transducción | | Salida |
|-------------------------------|---------------------|--------------|--|--|
| Medio extracelular | Membrana plasmática | | Medio intracelular o membrana plasmática | |
| Mensajero Primario (Hormonas) | Receptor | proteína G | Efector | Segundo Mensajero; Potencial de Membrana |

Ejemplos:

| | | | | |
|-------------|------------|----|-----|----------|
| Histamina | H1 | Gs | AC | AMPC |
| Epinefrina | $\alpha 1$ | Gp | PLC | IP3, DAG |
| Vasopresina | V1 | Gp | PLC | IP3, DAG |
| Epinefrina | $\alpha 2$ | Gi | AC | AMPC |

A principios de siglo fué introducido el concepto de receptor. Langley, al estudiar la unión mioneural como el sitio de acción de la nicotina y del curare, interpretó el antagonismo entre estos agentes como el resultado de un mutuo desplazamiento por el mismo sitio de acción (1).

Los receptores son proteínas de alto peso molecular y como se mencionó anteriormente pueden localizarse en la membrana plasmática o en el interior celular. Entre sus funciones principales se encuentran: uno, la de reconocer al mensajero químico con alta selectividad y afinidad; y dos, ser capaces de activar un sistema de transducción encargado de la propagación intracelular de la señal hormonal.

Los receptores, además de unir al mensajero natural, pueden unir agentes farmacológicos capaces de bloquear al receptor (antagonistas) o bien de activarlo (agonistas). Estos agentes pueden diferir del mensajero natural, tanto en afinidad como en actividad intrínseca, y con base en el orden de afinidad que tienen los diferentes receptores por los agonistas o antagonistas es que se puede realizar su clasificación, (1,57).

Una vez que el receptor recibe la señal del mensajero natural, sufre un cambio de conformación que le permitirá activar al efector capaz de generar un segundo mensajero químico. Este nuevo mensajero será el encargado de propagar la señal en el interior celular (58). Este acoplamiento entre el receptor y el mensajero natural esta mediado en la mayoría de los casos por una proteína acopladora G.

Se han realizado importantes esfuerzos por decifrar la estructura de los receptores y con base en analogías con la bacteriorodopsina y en el análisis de modelos por computadora, se ha visto que los receptores acoplados a proteínas G pertenecen a una superfamilia de proteínas que atraviesan la membrana plasmática siete veces y que tienen un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular. Es importante mencionar que la longitud y la composición de los extremos amino y carboxilo, y de las asas intra- y extracelulares que conectan a los dominios transmembranales, son las que determinan la especificidad de unión de los receptores a un ligando y la interacción con las proteínas G, (2,73,79).

En contraste con los receptores acoplados a las proteínas G, existen receptores para una variedad de factores de crecimiento que incluyen al factor de crecimiento epidérmico (EGF), al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), a la insulina y al factor de crecimiento-I parecido a la insulina (IGF-I), cuyas acciones parecen estar reguladas por la autofosforilación y por la fosforilación de otras proteínas, debido a su actividad de tirosinas cinasas, y no por su acoplamiento a proteínas G (3).

La participación de las proteínas G en la transducción de las señales hormonales fue propuesta por Martín Rodbell y su grupo, quienes descubrieron que en membranas plasmáticas

purificadas la activación de la adenilato ciclasa por hormonas requería de GTP, así se propuso la existencia de proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina (proteínas G) capaces de acoplar a los receptores con la adenilato ciclasa (4).

Las proteínas G son heterotrímeros formados de las subunidades α , β y γ , que durante su activación intercambian GDP por GTP, lo cual provoca la disociación de sus componentes en α -GTP más el dímero $\beta\gamma$.

Las subunidades alfa presentan pesos moleculares diversos entre 39 y 50 kDa, tienen como funciones unir e hidrolizar GTP; además definen la especificidad de una proteína G por el receptor y el efector, y son distintas entre diferentes proteínas G. Las subunidades alfa pueden ser activadas por GTP o por sus análogos no hidrolizables (Gpp[NH]p, GTP γ S, etc), así como por el fluoruro de sodio (2).

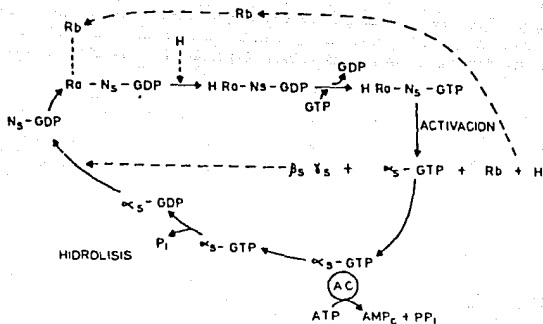
Las subunidades alfa de algunas proteínas G son sustrato de ADP-ribosiltransferasas bacterianas (72), tales como la toxina de Vibrio cholera (toxina del cólera) que requiere un cofactor proteico para su acción y depende de GTP para su actividad, y la toxina de Bordetella pertussis (toxina pertussis) que depende de ATP para su acción (2). Ambas toxinas utilizan al NAD como sustrato y actúan transfiriendo la parte de ADP-ribosa del NAD a las subunidades alfa de las proteínas G. Esta acción bloquea la actividad de GTPasa (hidrólisis del GTP) de las subunidades alfa (78).

Por estudios de purificación y clonación molecular se han logrado identificar hasta ahora a 12 subunidades alfa, y entre las que se han descrito se encuentran α_s , α_i , α_o , α_t , α_{olf} y α_q , entre otras (2,76).

Con respecto a las subunidades β y γ solo se han identificado dos tipos de subunidades beta con pesos moleculares entre 35-36 kDa y sólo dos subunidades gama con pesos moleculares entre 6 y 10 kDa (2).

En cuanto a la participación de $\beta\gamma$ en la transducción, es poco lo que se sabe. Su asociación con la subunidad α -GDP constituye la forma inactiva de las proteínas G ($\beta\gamma\alpha$ -GDP). Se sabe que el complejo $\beta\gamma$ constituye una poza heterógena, cuyos componentes son compartidos por todas las proteínas G y la formación del complejo $\alpha\beta\gamma$ es lo que promueve la interacción de las subunidades α con los receptores (R). Este nuevo complejo R- $\beta\gamma\alpha$ -GDP, coloca a los receptores en un estado de alta afinidad por las hormonas y a las subunidades α en un estado que permita su activación y asociación con el GTP, (5,77). (ESQUEMA 1).

Dentro de las funciones que se han sugerido para el complejo $\beta\gamma$, esta su participación en la inhibición de la adenilato ciclasa por su asociación con G α_s -GTP (6,71). Incluso, algunos grupos han propuesto la participación del complejo $\beta\gamma$ en la activación de la PLA₂, (7,71) y otros han observado que las subunidades $\beta\gamma$ son capaces de interactuar con algunos tipos de canales iónicos (74,75).



ESQUEMA 1. MODELO CINETICO DE LA INTERACCION DE LA PROTEINA Gs (Ns) CON LA ADENILATO CICLASA.

Ra, receptor en alta afinidad; Rb, receptor en baja afinidad; Ns, proteína acopladora Gs; y AC, adenilato ciclasa.

Las proteínas G funcionan principalmente acoplando a los receptores con los efectores.

En cuanto a los efectores son pocos los que se han descrito; entre ellos se encuentran la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, la fosfodiesterasa del GMPC, la fosfolipasa A2 y los canales iónicos. Estos componentes son de naturaleza proteica y la mayoría de ellos tienen como función la generación de segundos mensajeros que participan en la amplificación y propagación de la señal hormonal en el interior de la célula.

La adenilato ciclasa genera al segundo mensajero AMP cíclico a partir de la hidrólisis del ATP; la fosfolipasa C hidroliza a un fosfolípido de membrana generando al diacilglicerol y al inositol trifosfato; la guanilato ciclasa genera GMP cíclico a partir del GTP; la fosfolipasa A2 hidroliza fosfolípidos de membrana generando así al ácido araquidónico que es un presursor de compuestos biologicamente activos como los eicosanoides; y finalmente los canales iónicos que pueden ser activados por diversos mecanismos y funcionan permitiendo el flujo de iones através de la membrana plásmatica.

Después de la activación de los efectores, corresponde a los segundos mensajeros la propagación de la señales hormonales.

Hasta el momento los sistemas de transducción que se han descrito mejor son: el sistema de la adenilato ciclasa y el sistema fosfoinosítidos-calcio.

SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA.

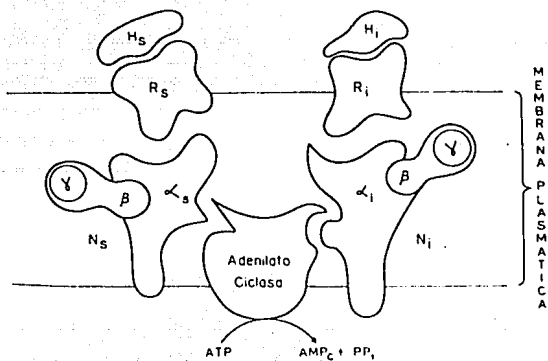
Los primeros estudios que arrojaron una luz importante sobre el sistema de la adenilato ciclasa, fueron realizados por Sutherland y su grupo, quienes fueron los primeros en observar que las hormonas podían modular los niveles de AMPc.

Existen muchas hormonas que modulan los niveles de AMP cíclico en las células; algunas los incrementan como el glucagón, la vasopresina (V1), y la hormona luteinizante (LH), y otras los inhiben como la acetilcolina y la somatostatina. Además algunas de ellas como por ejemplo la epinefrina a través de receptores diferentes son capaces de inducir ambas acciones.

Este sistema de transducción consta principalmente de cinco componentes: Receptores estimuladores (Rs), Receptores inhibidores (Ri), proteína G estimuladora (Gs), proteína G inhibidora (Gi) y la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. (ESQUEMA 2).

La proteína Gs, como se mencionó en la sección precedente, se encuentra formada por tres subunidades, α , β y γ . Para la proteína Gs la subunidad α se denomina α_s .

La subunidad α_s de la proteína Gs tiene como función activar a la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa y entre sus propiedades esta la de ser uno de los substratos de la toxina del cólera. La reacción de ADP-ribosilación en un residuo de arginina, catalizada por la toxina del cólera,



ESQUEMA 2. SISTEMA DE TRANSDUCCION DE LA ADENILATO CICLASA.

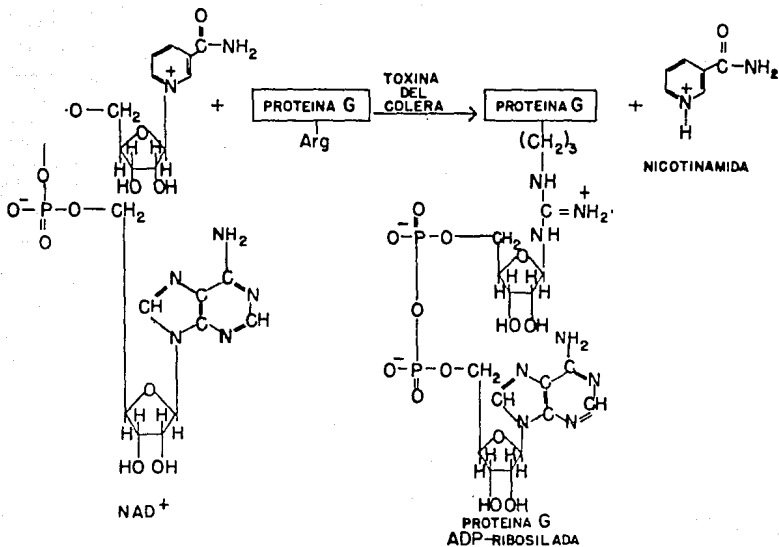
H_s, hormona estimuladora; H_i, hormona inhibidora;
 R_s, receptor estimulador; R_i, receptor inhibidor;
 N_s, proteína acopladora G_s; y N_i, proteína acopladora G_i.

bloquea la actividad de GTPasa de α_s , de tal manera que el complejo α_s -GTP ADPribosilado provoca una activación permanente de la adenilato ciclasa. (8,10,11). (ESQUEMA 3).

Estudios de clonación molecular han revelado la existencia de 4 formas de α_s , dos formas cortas con 380 y 381 aminoácidos y dos largas con 394 y 395 aminoácidos. La subunidades α_s son muy heterogéneas y en una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS presentan pesos moleculares entre 42 y 52 kDa. (2,76).

La proteína Gi es parte de una familia de proteínas conocida como "Gi-like". La proteína Gi también se encuentra formada por tres subunidades α_i , β y γ , y participa en la inhibición de la adenilato ciclasa. Gracias a los estudios de clonación molecular se ha logrado identificar a tres subunidades α_i y se les ha denominado α_i -1, α_i -2 y α_i -3, estas proteínas poseen una longitud de 354, 355 y 354 aminoácidos respectivamente (2). Las subunidades α_i son sustrato de la toxina pertussis (9), siendo la forma heterotrimérica de la proteína G, el sustrato preferido de la toxina. La ADP-ribosilación de la subunidad α_i en un residuo de cisteína bloquea su actividad de GTPasa y por lo tanto también bloquea la actividad inhibitoria que ejerce la proteína Gi sobre la adenilato ciclasa.

En cuanto al elemento efector del sistema, se ha observado que la adenilato ciclasa existe como múltiples especies moleculares. Al menos una forma de la enzima en cerebro es



ESQUEMA 3. ADP-RIBOSILACION DE LA PROTEINA G_s POR LA TOXINA DEL COLERA.

activada por calmodulina, probablemente de manera directa, mientras que otras formas de la enzima son activadas directamente por el diterpeno, forskolina, aislado de las raíces de la hierba Coleus forskohlii, (14). Esta enzima ha sido purificada de corazón (12) y de cerebro (13). Estos estudios han mostrado que la enzima posee una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 150,000; y además parece ser una glucoproteína. (12-14,80). Estos datos han sido confirmados recientemente por estudios de biología molecular, ya que el grupo de Gilman ha logrado la clonación de esta proteína (31).

La subunidad catalítica de la adenilato ciclasa cuando se activa hidroliza el ATP a AMPc más PPI. El AMP cíclico así generado, funciona como un segundo mensajero capaz de activar a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). En ausencia de AMPc la PKA esta inactiva y constituida por 2 subunidades reguladoras y 2 catalíticas. La unión del AMPc a la subunidad reguladora altera su afinidad por la subunidad catalítica; esto es suficiente para provocar su disociación en un dímero de subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas libres (15).

La PKA es capaz de fosforilar a otras proteínas en residuos de serina o treonina, y la cascada de fosforilaciones que inicia es parte de la amplificación y propagación de la señal hormonal.

En el estudio del sistema de la adenilato ciclasa ha sido importante el uso de mutantes de la línea celular S49 de linfoma de ratón, como modelos con características que han permitido estudiar las funciones de los componentes de este sistema. La línea silvestre S49 posee receptores β -adrenérgicos y receptores para prostaglandinas, y responde a los análogos estables del GTP, al fluoruro de sodio y a la forskolina. (16).

Entre las formas mutantes de esta línea celular se encuentran las células S49 cyc- que carecen de la proteína acopladora Gs (17), las S49 kin- que carecen de la PKA (18,19), las S49 unc- donde no existe un acoplamiento entre los receptores y la proteína Gs (20) y la variante AC- que carece de la actividad de la adenilato ciclasa (20).

SISTEMA FOSFOINOSITIDOS CALCIO.

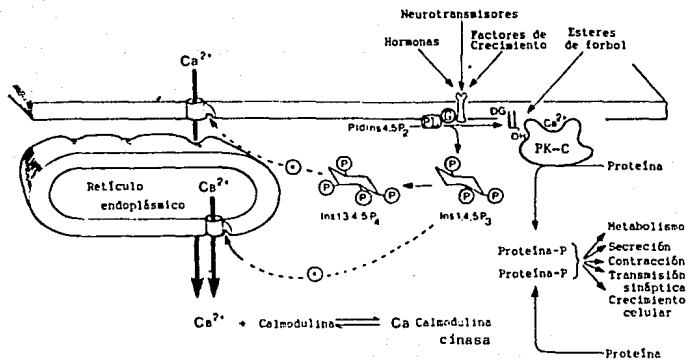
Ciertas hormonas activan receptores capaces de inducir la hidrólisis de fosfolípidos y el aumento del calcio intracelular, como un mecanismo para transducir señales extracelulares hacia la célula. Algunas de estas hormonas son epinefrina, angiotensina II y vasopresina (81).

Lowell y Mabel Hokin fueron los primeros en observar que mensajeros químicos como la acetilcolina, inducían la incorporación de fósforo 32 al fosfatidil inositol y al ácido fosfatídico. R. Michell en 1975 sugirió que el recambio de fosfoinosítidos estaba asociado con el incremento de la concentración de calcio citosólica intracelular estimulado por un receptor (27), y más tarde Berridge propuso que un fosfolípido de membrana era hidrolizado por la fosfolipasa C en respuesta a la activación de un receptor (28).

Este sistema de transducción está constituido por tres componentes: un receptor, una proteína G (llamada Gq) y por una fosfodiesterasa, la fosfolipasa C (PLC). (ESQUEMA 4).

La proteína G que participa en este sistema no ha sido claramente identificada; sin embargo hay una serie de evidencias que apoyan su existencia, y se le ha llamado Gp o Gx (14), y más recientemente fué denominada Gq.

Los primeros datos sobre la participación de una proteína G en este sistema, surgieron en la década de los 80's con los



ESQUEMA 4. SISTEMA DE TRANSDUCCION FOSFOINOSITIDOS-CALCIO.

G, proteína acopladora Gp; PL, fosfolipasa C; DG, diacilglicerol; Ins 1,4,5 IP₃, inositol trifosfato; y PK-C, proteína cinasa C.

trabajos del grupo de Cockroft y Gomperts (22), y del grupo de Fain (23), quienes demostraron que los análogos estables del GTP estimulan la actividad de la PLC en membranas aisladas, y que los nucleótidos de guanina son requeridos para la activación de la enzima mediada por un receptor, sugiriendo así la existencia de una proteína G. Los eritrocitos de pavo, son uno de los sistemas donde se observa más claramente como la actividad de la PLC regulada por los receptores purinérgicos P₂ y es dependiente de GTP (24).

Aunque la identidad de la proteína G_p o G_q no se conoce, se ha sugerido la existencia de al menos dos: una sensible y una insensible a la toxina pertussis. (21). Por otro lado la inhibición hormonal de la PLC ha sido reportada, pero no es clara la existencia de una proteína G_q inhibitoria. (25).

La fosfolipasa C (PLC) es una fosfodiesterasa que utiliza como sustrato un fosfolípido de membrana, el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) y lo hidroliza para formar dos segundos mensajeros: el 1,2-diacilglicerol (DAG) y el mioinositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), (21,82,83).

Se han identificado al menos cinco diferentes isoenzimas de la PLC, α , β , γ , δ y ϵ , difieren una de otra con respecto a su peso molecular, carga, requerimientos de cationes divalentes, especificidad de sustrato y la forma de los productos liberados (fosfatos cíclicos o no cíclicos) (26) y además se ha visto que hay especies de PLCs solubles y otras asociadas a membrana.

En el estudio de la PLC, han habido avances como: el aislamiento de dos isozimas de la PLC de vesículas seminales de oveja, que son distintas inmunologicamente; la purificación de tres isoenzimas de cerebro de bovino y la preparación de anticuerpos específicos dirigidos contra estas enzimas (lo que ha permitido intentar la clasificación de las PLCs en base a sus características inmunológicas); y el avance más importante que se ha alcanzado es la clonación de 4 genes que codifican para 4 distintas formas de PLC con pesos moleculares de 56 kDa, 86 kDa, 138-139 kDa y 148 kDa. (21).

Los segundos mensajeros generados por activación de la fosfolipasa C, el DAG y el IP₃, juegan un papel muy importante en la amplificación de la señal hormonal.

El IP₃ participa en la movilización de calcio de pozas intracelulares, principalmente de retículo endoplasmico. Se ha propuesto la existencia de receptores para el IP₃ en el retículo, que provocan la apertura de canales de calcio (84), ocasionando así un aumento en la concentración de calcio citosólico e induciendo una serie de cambios en el metabolismo celular. (29,32).

La concentración de calcio libre citosólica funciona como un importante mecanismo por el cual las hormonas y los factores de crecimiento regulan muchos procesos celulares tales como la secreción, el metabolismo, la liberación de neurotransmisores, el crecimiento celular y la diferenciación.

Se ha llegado a la conclusión de que la mayor parte del calcio secuestrado está en el retículo endoplásmico y que estas pozas representan la fuente del calcio liberado por agentes movilizadores de calcio. El aumento del calcio intracelular es rápidamente disminuido por su captura a través de la mitocondria y por su expulsión fuera de la célula por la ATPasa de calcio (85).

La mitocondria no esta implicada en la liberación de Ca^{++} mediada por IP_3 , pero responde al incremento de calcio libre citosólico, al capturarlo e incrementar la concentración de calcio libre en la matriz mitocondrial con la consecuente activación de la respiración y de las deshidrogenasas mitocondriales.(30).

Hay tres deshidrogenasas intramitocondriales cuya actividad puede ser estimulada por un aumento en la concentración de calcio citosólico y son la piruvato deshidrogenasa (PDH), la NAD^{+} -isocitrato deshidrogenasa (NAD -ICDH) y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH), todas ellas consideradas importantes en el metabolismo oxidativo. (30).

El inositol trifosfato es rápidamente recambiado, puede ser fosforilado por una cinasa formando inositol-1,3,4,5-tetrafosfato (IP_4), el cual parece tener un papel en la regulación de la entrada de calcio extracelular, de tal manera que se regulen los niveles de calcio modificados por la acción del IP_3 (86). El IP_3 también puede ser degradado por

fosfatasa a mioinositol-1,4-bisfosfato (IP₂), mioinositol-1-fosfato (IP₁) y mioinositol.

El otro segundo mensajero generado por la PLC es el diacilglicerol (DAG). Bajo condiciones fisiológicas la estimulación hormonal de la hidrólisis de fosfolípidos induce la formación del DAG el cual activa a la proteína cinasa C (PKC) además de incrementar su afinidad por calcio y fosfolípidos (33).

La proteína cinasa C fue descubierta por Y. Nishizuka y colaboradores en 1977. Esta enzima fosforila a otras proteínas en residuos de serina o treonina y tiene un papel muy importante en la transducción de las señales hormonales. Se ha observado que esta enzima requiere de calcio y de fosfolípidos en especial de fosfatidilserina para su activación.

La proteína cinasa C constituye una familia de subespecies muy relacionadas estructuralmente. Los estudios bioquímicos y de clonación molecular han permitido identificar a 7 isoenzimas denominadas α , β I, β II, γ , δ , ϵ y ζ (31). Las últimas tres subespecies difieren principalmente de las otras en que carecen de la región conservada C2 y además en sus requerimientos de calcio y fosfolípidos para su activación (34,87).

Existen varias rutas alternativas para la generación del DAG necesario para la activación de la PKC. La apertura de canales de Ca⁺⁺ puede ocasionar la degradación de fosfolípidos, que probablemente se inicio por activación de la

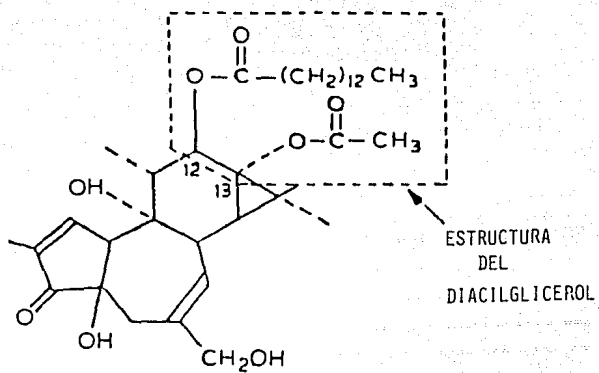
PLC y también de las PLD y PLA2. Los fosfolípidos generados como el DAG y el ácido araquidónico son capaces de activar a la PKC (31).

Inicialmente se detectó que la PKC era activada por proteólisis con calpaina. Esta reacción genera un fragmento totalmente activo denominado proteína cinasa M (33,35). Se desconoce el significado fisiológico de esta proteólisis, sin embargo se ha sugerido que sea un proceso que inicie la degradación, llamada "down regulation", de la PKC.

La PKC también puede ser activada farmacológicamente con agentes como los ésteres de forbol. Estos compuestos diterpénicos son potentes agentes tumorigénicos que son obtenidos del aceite de las semillas del árbol Croton tiglium, y por tener una estructura similar a la del DAG pueden activar a la PKC (36). Entre los más potentes se encuentran el forbol miristato acetato (PMA) y el forbol dibutirato (PDBu). (ESQUEMA 5).

Entre los sustratos de la PKC están los receptores α_1 - y β -adrenérgicos, el receptor de la insulina, el receptor del factor de crecimiento epidérmico, la proteína G_i , la adenilato ciclasa, la guanilato ciclasa, proteínas membranales como las ATPasas de Ca^{++} , de Na^+/K^+ , el transportador de glucosa, proteínas de citoesqueleto como la vinculina, entre otras.

La proteína cinasa C puede ser inhibida por compuestos que compiten con el ATP como la estauroesporina, la sangivamicina y los derivados isoquinolina-sulfonamida como el H-7. Otro

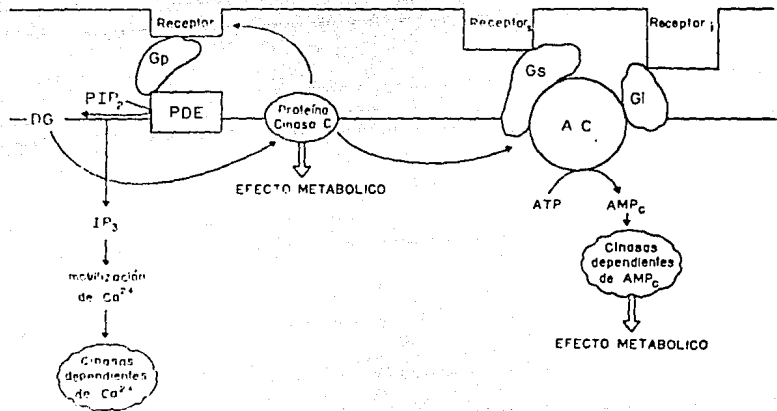


ESQUEMA 5. PMA, FORBOL MIRISTATO ACETATO (ESTER DE FORBOL).

tipo de inhibidores son la esfingosina, los lisofosfolípidos, el verapamil, la amilorida y los derivados de acridina; cuyo mecanismo de acción se desconoce. (41-43).

La comunicación entre los sistemas de transducción es uno de los mecanismos más importantes de regulación de la transducción de las señales hormonales. Han sido muchos los estudios que se han realizado en este campo, tratando de dilucidar los mecanismos y las consecuencias de esta interrelación.

La proteína cinasa C es uno de los elementos que tiene un papel muy importante en la regulación de los componentes de los sistemas de transducción. Su activación induce una cascada de fosforilaciones de diversas proteínas que modifican su actividad basal. Esta acción que tiene la PKC sobre los componentes de la transducción puede ser una regulación positiva o negativa. Es decir puede ocasionar una potenciación o sinergismo de la señal hormonal o bien una desensibilización o bloqueo del sistema. Estas acciones de la PKC han sido ampliamente documentadas. (ESQUEMA 6).



ESQUEMA 6. REGULACION : DEL SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA Y DEL SISTEMA FOSFOINOSITIDOS-CALCIO, POR LA PROTEINA CINASA C.

GLUCAGON

El glucagon es una de las principales hormonas pancreáticas, secretada por las células α de los islotes de Langerhans. Esta hormona esta compuesta por una sola cadena de aminoácidos con 29 residuos y con un peso molecular de 3450.

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| NH2-His | -Ser | -Gln | -Gly | -Thr | -Phe | -Thr | -Ser | -Asp | -Tyr | -Ser | -Lys | -Tyr | -Leu- |
| 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |
| -Asp | -Ser | -Arg | -Arg | -Ala | -Gln | -Asp | -Phe | -Val | -Gln | -Trp | -Leu | -Met | -Asn- |
| | Thr | | | | | | | | | | | Ser | |
| 29 | | | | | | | | | | | | | |
| -Thr | -COOH | | | | | | | | | | | | |

Secuencia primaria del GLUCAGON

El glucagon fue descubierto por Murlin y colaboradores. Se sabe que esta hormona es biosintetizada como un precursor de alto peso molecular; se han encontrado especies entre 9000-12000 daltones en tejidos de mamíferos, aves y peces; y se ha concluido que los 29 residuos del extremo amino corresponden a la secuencia del glucagon. (37).

La secreción del glucagon es estimulada por una caída en los niveles de glucosa en sangre o por un aumento en los niveles de ácidos grasos libres o de ciertos aminoácidos.

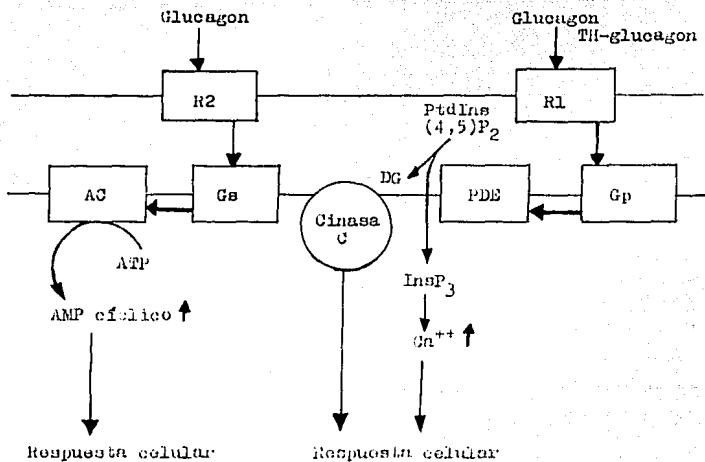
El glucagon es homólogo estructuralmente con una familia de hormonas peptídicas del tracto gastrointestinal, entre ellas la secretina, el polipeptido intestinal vasoactivo

(VIP), el peptido inhibitorio gastrico (GIP) y la glicentina.

Se considera al glucagon, como uno de los más potentes agentes reguladores del metabolismo hepático, capaz de estimular vías metabólicas como la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis principalmente (88).

Las acciones del glucagon estan mediadas por un receptor de membrana, que aún no ha sido totalmente caracterizado; sin embargo se ha logrado identificar a un componente de la membrana de 62 KDa, usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de glucagon. (89). Este receptor es capaz de activar al sistema de la adenilato ciclasa y se ha considerado al segundo mensajero AMP cíclico como el mediador intracelular de las acciones del glucagon.

Sin embargo, ha surgido cierta controversia en este tema. En 1984, Corvera y colaboradores propusieron que existía otros factores implicados en las acciones de glucagon, además del AMP cíclico. Sus estudios se basan en el uso de un análogo del glucagon hecho por una trinitrofenilación del grupo $-NH_2$ del 12-homoarginina glucagon (THG). Ellos encontraron que el THG es un agonista total para la estimulación de la glucogenólisis, gluconeogénesis y síntesis de urea, pero es un agonista parcial muy débil para la acumulación de AMP cíclico (39). Con base en estos estudios, más tarde en 1986, Wakelam y colaboradores (38), propusieron que las células del hígado poseen dos receptores para glucagon, uno acoplado a la adenilato ciclasa y otro a la P.I.C. (ESQUEMA 7).



ESQUEMA 7. MECANISMO DE ACCION QUE SE HA SUGERIDO PARA EL GLUCAGON.
 R, receptor; G, proteína fijadora de GTP; AC, adenilato ciclasa; y PDE, fosfolipasa C.

El grupo de Wakelam muestra que tanto el glucagon como su análogo el THG son capaces de estimular la formación de IP₃ y de incrementar la [Ca⁺⁺] citosólica. (38). Otros grupos también apoyan la idea de que la movilización de calcio estimulada por glucagon es independiente del AMPc (90).

Existen otros grupos que consideran que todas las acciones del glucagon están mediadas exclusivamente por el AMP cíclico; por ejemplo Staddon y Hansford (40) muestran datos que indican que un aumento en el AMPc asociado con una activación de la PKA son suficientes para explicar el aumento en la concentración de calcio que ocurre después de adicionar glucagon a los hepatocitos, pero sin embargo no descartan una activación del sistema fosfoinosítidos-Ca⁺⁺.

En hepatocitos de perro, se observa una heterogeneidad en la población de receptores para glucagon. El grupo de Hruby, utilizando al glucagon y a algunos de sus análogos, detecta dos sitios de unión para glucagon, uno en alta y otro en baja afinidad, (93,94). Estos estudios también apoyan la existencia de dos receptores para el glucagon.

El glucagon se encuentra dentro del grupo de hormonas que regulan tanto el metabolismo citosólico como el mitocondrial. No es claro, cual es el mecanismo por el cual estimulan el metabolismo mitocondrial, pero se ha sugerido que sus acciones están relacionadas más con la movilización de calcio que con un aumento de AMP cíclico, (51,53,91).

Otra de las acciones interesantes que ejerce el glucagon, es la de inhibir la bomba de calcio independientemente de la activación de la adenilato ciclasa. Los resultados mostrados por el grupo de F. Pecker (92), sugieren que el glucagon puede ser un precursor de un péptido biológicamente activo que se genera por proteólisis y que corresponde al extremo carboxilo terminal del glucagon (residuos 19-29).

A partir de estos datos parece ser que el glucagon ya no es un ejemplo de las hormonas que actúan solamente vía el AMPc, sino que existen otros factores implicados en sus acciones.

Ha sido ampliamente documentada la inhibición, por la proteína cinasa C, de las acciones de hormonas cuyos receptores están acoplados a la adenilato ciclasa, entre ellas el glucagon; sin embargo los mecanismos implicados en esta regulación no han sido del todo aclarados, y de ahí nuestro interés en tratar de dilucidar estos mecanismos y establecer la forma en que la proteína cinasa C participa en la regulación de las señales hormonales.

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general, evaluar la participación de la proteína cinasa C en la modulación de las acciones del glucagon sobre el metabolismo hepático de rata, así como estudiar la influencia del estado tiroideo de los animales sobre dichas acciones.

MATERIALES Y METODOS

Estos se describen en los articulos anexados en la seccion de resultados.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis fueron publicados en los siguientes trabajos:

- 1.- García-Sáinz, J.A., S.M.T. Hernández-Sotomayor, J.L. Contreras-Rodriguez and M. Macias-Silva. (1989). Effect of H-7 on the modulation on glucagon actions by activators of protein kinase C. Biochem. Intern. 18(1): 243-249.
- 2.- García-Sáinz, J.A., M. Macias-Silva, S.M.T. Hernández-Sotomayor, M.E. Torres-Márquez, V. Hraby and D. Trivedi. (1990). Modulation of glucagon actions by phorbol myristate acetate in isolated hepatocytes. Effect of hypothyroidism. Cell. Signall. 2(3):235-243.
- 3.- Hernández-Sotomayor, S.M.T., M. Macias-Silva, C.C. Malbon and J.A. García-Sáinz. (1991). Modulation of Gs activity by phorbol myristate acetate in rat hepatocytes. Am. J. Phys. 260(Cell Physiol. 29):C259-C265.

EFFECT OF H-7 ON THE MODULATION OF GLUCAGON ACTIONS
BY ACTIVATORS OF PROTEIN KINASE-C.

J. Adolfo García-Sáinz, S.M. Teresa Hernández-Sotomayor, J. Luis Contreras-Rodríguez and Marina Macías-Silva.

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

Received September 12, 1988

Summary:

The stimulations of ureagenesis and cyclic AMP accumulation induced by glucagon were inhibited by 10 nM vasopressin or 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). The maximal accumulation of cyclic AMP induced by glucagon was clearly diminished by these agents without change in the EC_{50} for the peptide hormone suggesting a non-competitive type of inhibition. H-7 blocked the inhibition of glucagon-stimulated ureagenesis induced by PMA and vasopressin and diminished their effect on the accumulation of cyclic AMP induced by glucagon. It is concluded that activation of protein kinase C inhibits the stimulation of ureagenesis and the accumulation of cyclic AMP induced by glucagon in liver cells from hypothyroid rats; H-7 inhibits the effects of protein kinase C activation.

INTRODUCTION

Glucagon is one of the main modulators of hepatic metabolism, it exerts its actions through activation of receptors coupled in an activatory fashion to adenylate cyclase (1). Heterogeneity of glucagon receptors has been observed (2,3) and it has been suggested that factors, in addition to cyclic AMP, may participate in mediating glucagon actions (4,5).

Activation of protein kinase C by phorbol esters inhibits glucagon-stimulated adenylate cyclase activity in membranes (6) and the accumulation of cyclic AMP induced by this peptide hormone in whole cells (6-8). Interestingly, such diminution of the accumulation of cyclic AMP is associated with a very slight shift in the dose-response curve to glucagon for some metabolic actions (phosphorylase activation (7) or ureagenesis (8)) in normal rat hepatocytes. Using hepatocytes isolated from hypothyroid rats we show here that activation of protein kinase C by vasopressin or by an active phorbol ester reduces both the cyclic AMP accumulation and the stimulation of ureagenesis induced by glucagon; the protein kinase inhibitor H-7 markedly diminishes such reductions.

MATERIALS AND METHODS

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 6-N-propyl-2-thiouracil, methylisobutyl-xanthine, urease, L-glutamine, arginine-vasopressin, L-ornithine and H-7 (1-(5-isouquinolyl sulfonyl)-2-methylpiperazine)) were obtained from Sigma Chemical Co. Glucagon was generously given by Eli Lilly. [³H] cyclic AMP (32 Ci/mmol) was from New England Nuclear.

Female Wistar rats (approx. 200-250 g) fed ad libitum were used. Hypothyroidism was induced by giving the animals water containing 0.03% 6-N-propyl-2-thiouracil for 40-50 days and it was assessed by decreased weight gain, dryness of the fur and decreased levels of triiodothyronine (9).

Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (10). The cells were incubated in 1 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer under an atmosphere of 95% O₂ - 5% CO₂, pH 7.4, at 37°C in a water bath shaker. In the studies on ureagenesis, the medium was supplemented with 2 mM ornithine and 10 mM glutamine; after 60 min of incubation urea was quantified in the supernatant by the method of Gutman and Bergmeyer (11). Cyclic AMP accumulation was determined in cells plus medium by the method of Brown et al. (12). The cyclic AMP determinations were performed in cells stimulated with glucagon for 2 min and incubated during this period with 0.1 mM methylisobutyl-xanthine to inhibit phosphodiesterase activity.

RESULTS

Activation of hepatocytes with glucagon produced a dose-dependent stimulation of ureagenesis (Fig 1, panel A) and accumulation of cyclic AMP (Fig 1, panel B). We have previously shown (9) that in liver cells obtained from hypothyroid rats vasopressin is unable to produce a sustained stimulation of ureagenesis. As expected, in these experiments (using hepatocytes obtained from hypothyroid animals) 10 nM vasopressin did not stimulate ureagenesis but surprisingly markedly decreased (\approx 60-70%) the effect of glucagon on this parameter (Fig. 1, panel A). A nearly identical effect was observed using the active phorbol ester PMA (Fig 1, panel A), PMA by itself did not alter the production of urea (results not shown, please see 13). Vasopressin and PMA decreased the accumulation of cyclic AMP induced by glucagon approximately 40-50% (Fig. 1, panel B). The effects of vasopressin and PMA were on the maximal accumulation of cyclic AMP without altering the EC₅₀ (\approx 10⁻⁹ M) for glucagon clearly suggesting a non-competitive type of inhibition.

H-7 is an isoquinoline sulfonyl derivative that potently inhibits protein kinase C (14). We have previously shown that hormonal (i.e. by vasopressin) or pharmacological (by PMA) activation of protein kinase C blocks alpha₁-adrenergic responsiveness in liver cells (13,15,16) and that this protein kinase C antagonist, avoids such blockade (15).

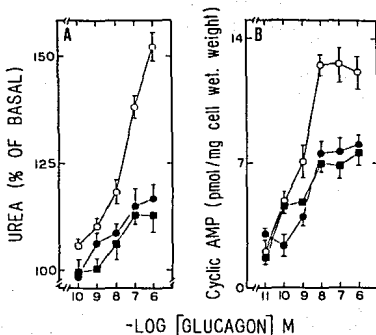


Fig. 1. EFFECT OF PMA AND VASOPRESSIN ON THE STIMULATIONS OF UREAGENESIS AND CYCLIC AMP ACCUMULATION BY GLUCAGON.

Hepatocytes were incubated in the absence (○) or presence of 100 nM PMA (●) or 10 nM vasopressin (■) for 60 minutes; in the studies on ureagenesis (panel A) glucagon was present during the 60 minutes and the results are expressed as percentage of basal urea production which was 40 ± 1 nmol/mg cells wet weight. In the studies on cyclic AMP accumulation glucagon and 0.1 mM methyl-isobutyl-xanthine were present only during the last two minutes of incubation (total 60 min). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 6-12 determinations using different cell preparations.

In hepatocytes incubated with H-7 the dose-response curve to glucagon for ureagenesis was not significantly altered by either vasopressin or PMA (Fig. 2, panel A). When cyclic AMP accumulation was studied we observed that in spite of the presence of H-7 some diminutions (10-20%) of the effect of glucagon were induced by vasopressin and PMA (Fig. 2, panel B). However, it is clear that H-7 markedly reduces the inhibition induced by these agents (please compare Figs. 1 and 2).

DISCUSSION

We, measuring ureagenesis (8) and others, assaying phosphorylase (7) observed in hepatocytes from euthyroid rats that PMA decreases glucagon-induced cyclic AMP accumulation without inducing major changes on the

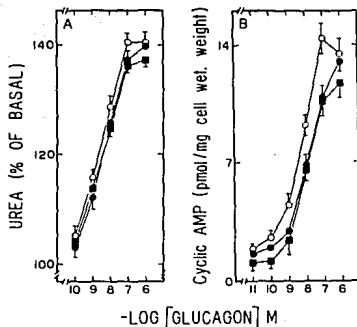


Fig. 2. INHIBITION BY H-7 OF THE EFFECTS OF PMA AND VASOPRESSIN ON THE ACTIONS OF GLUCAGON.

Hepatocytes were incubated as indicated in figure 1, but in the presence of 0.1 mM H-7. Basal urea production was 45 ± 2 nmol/mg cells wet weight. Other indications as in figure 1.

metabolic responses. Other authors have observed that some actions of glucagon, such as stimulation of hepatic ketogenesis (17) or activation of pyruvate dehydrogenase are markedly diminished by PMA (18). Interestingly, Staddon and Hansford (18) observed that PMA does not diminish the inactivation of pyruvate kinase induced by glucagon in conditions under which it blocks the activation of pyruvate dehydrogenase induced by this hormone.

We are surprised by the inhibition of the glucagon-induced stimulation of ureagenesis by PMA and vasopressin (via protein kinase C activation) in cells obtained from hypothyroid rats. The data are particularly astonishing if we consider that the diminution of glucagon-mediated accumulation of cyclic AMP induced by PMA is very similar to that observed previously in liver cells from euthyroid rats (17). It is clear that in the action of glucagon, factors in addition to cyclic AMP play a role (4,5). However, it is yet far from clear what signal(s) or amplifying factor(s) is (are) lacking in liver cells from hypothyroid rats that makes their metabolism more susceptible to the

inhibitory action of PMA. In this regard it is worth mentioning that the mitochondrial actions of glucagon seem to be more susceptible to the inhibitory action of phorbol esters than those involving exclusively the cytosol (18). Ureagenesis is a bicompartmentalized pathway involving both cytosolic and mitochondrial enzymes; glucagon modulates glutaminase activity (19,20) and citrulline synthesis (21,23) both taking place in the mitochondria.

The ability of hormones that activate phosphoinositide turnover to diminish the accumulation of cyclic AMP induced by glucagon is well documented (24). However, the precise mechanism of this action is not completely known; a role of calcium redistribution has been proposed (24). Our results suggest that at least part of this effect may be mediated via protein kinase C activation. Consistent with this idea is the fact that inhibitions of cyclic AMP accumulation are usually observed even after a short preincubation with these hormones; at these times the inositol trisphosphate and calcium peaks are over (25) but not the accumulation of diacylglycerol (25,26) the physiological activator of protein kinase C.

H-7 is an inhibitor of protein kinase C which competes with ATP (14); therefore it has also the ability to inhibit other protein kinases such as protein kinase A (14,27). We observed little effect of H-7 on glucagon-stimulation of ureogenesis (mediated at least partially via activation of protein kinase A) under conditions in which it inhibits the actions of vasopressin and PMA. However, due to the type of experiments performed we can not rule out the possibility that the action of H-7 may involve inhibition of other protein kinase(s) in addition to protein kinase C.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by a Grant from Fundación Miguel Alemán. The authors thank Ms. Guadalupe Ramirez for skillfully typing the manuscript.

REFERENCES

1. Johnson, G.L., MacAndrew, V.I. and Pilch, P.F. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 78, 875-878.
2. Grady, T., Fickova, M., Tager, H.S., Trivedi, D. and Hruby, V. (1987) J. Biol. Chem. 262, 15514-15520.

3. Hagopian, W.A., Tager, H.S., Gysin, B., Trivedi, D. and Hruby, V. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 15506-15513.
4. Corvera, S., Huerta-Bahena, J., Pelton, J.T., Hruby, V. J., Trivedi, D. and García-Sáinz, J.A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 84, 434-441.
5. Wakelam, N.J.O., Murphy, G.J., Hruby, V.J. and Houslay, M.D. (1986) *Nature* 323, 68-71.
6. Heyworth, C.M., Whetton, A.D., Kinsella, A.R. and Houslay, M.D. (1984) *FEBS Lett.* 170, 38-42.
7. Lynch, C.J., Charest, R., Bocchino, S.B., Exton, J.H. and Blackmore, P.F. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2844-2851.
8. García-Sáinz, J.A., Mendlovic, F. and Martínez-Olmedo, M.A. (1985) *Biochem. J.* 228, 277-280.
9. Corvera, S., Hernández-Sotomayor, S.M.T. and García-Sáinz, J.A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 803, 95-105.
10. Berry, M.N. and Friend, D.S. (1969) *The Journal of Cell Biology* 43, 506-520.
11. Gutman, I. and Bergmeyer, H.U. (1974) In *Methods of Enzymatic Analysis*, (Bergmeyer, H.U., ed.) vol. 4, pp. 1791-1793; Academic Press, New York.
12. Brown, B.L., Albano, J.D.M., Ekins, P. and Sgherzi, A.M. (1971) *Biochem. J.* 121, 561-562.
13. Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128-1133.
14. Hidaka, H., Imagaki, M., Kawamoto, S. and Sasaki, Y. (1984) *Biochemistry* 23, 5036-5041.
15. Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M. and García-Sáinz, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 520-526.
16. García-Sáinz, J.A. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 417-421.
17. Kojima, H., Iizumo, Y., Kusagi, K., Nakano, T. and Shigeeda, Y. (1986) *FEBS Lett.* 201, 271-276.
18. Staddon, J.M., and Hansford, R.G. (1987) *Biochem. J.* 241, 729-735.
19. Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1983) *Biochem. J.* 210, 957-960.
20. Lacey, J.H., Bradford, N.M., Joseph, S.K. and McGivan, J.D. (1981) *Biochem. J.* 194, 29-33.
21. Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1982) *Life Sci.* 31, 2493-2498.
22. Verhoeven, A.J., Hensgens, H.E.S.J., Meijer, A.J. and Tager, J.M. (1982) *FEBS Lett.* 140, 270-272.

23. Titheradge, M.A. and Heynes, R.C. Jr. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 201, 44-55.
24. Assimacopoulos-Jeannet, F.D., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3759-3765.
25. Exton, J. H. (1985) Am. J. Physiol. 248, E633-E647.
26. Bocckino, S.B., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1985) J. Biol. Chem. 260, 14201-14207.
27. Loomis, C.R. and Bell, R.M. (1988) J. Biol. Chem. 263, 1682-1692.

MODULATION OF GLUCAGON ACTIONS BY PHORBOL MYRISTATE ACETATE IN ISOLATED HEPATOCYTES. EFFECT OF HYPOTHYROIDISM

J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ,*† MARINA MACÍAS-SILVA,* S. M. TERESA HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR,* MA. EUGENIA TORRES-MÁRQUEZ,*‡ DEV TRIVEDI§ and VÍCTOR J. HRUBY§

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México; †Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México; and ‡Department of Chemistry, University of Arizona, Tucson, Arizona, U.S.A.

(Received 20 October 1989; and accepted 8 November 1989)

Abstract—Phorbol myristate acetate (PMA) inhibits glucagon-stimulated cyclic AMP accumulation and shifts to the right the dose-response curve to glucagon for ureagenesis. In cells from hypothyroid rats the effect of PMA on glucagon-stimulated ureagenesis was much more pronounced, but its effect on cyclic AMP accumulation was similar to that observed in the control cells. The stimulations of ureagenesis by the glucagon analogue THG and dibutyryl cyclic AMP (But₂-cAMP) were also diminished by PMA, to a greater extent in cells from hypothyroid rats than in those from euthyroid rats. PMA inhibited the increases in cytoplasmic [Ca²⁺]_i induced by glucagon, THG or But₂-cAMP; the effect of PMA was much more marked in cells from hypothyroid rats than in the controls. Treatment of the cells with glucagon or THG increased the production of citrulline by subsequently isolated mitochondria, whereas PMA diminished their effects. The results suggest that PMA alters glucagon actions at least at two levels: (i) cyclic AMP production and (ii) elevation of cytosolic calcium. The increased sensitivity to PMA of some glucagon effects in hypothyroid rats seems to be related to the latter action.

Key words: Glucagon, protein kinase C, phorbol esters, ureagenesis, cyclic AMP, calcium.

INTRODUCTION

PHORBOL 12-myristate 13-acetate (PMA), a potent activator of protein kinase C, inhibits glucagon-stimulated adenylate cyclase activity in liver membranes and the accumulation of cyclic AMP in hepatocytes [1-5]. Such diminution of glucagon-stimulated cyclic AMP accumulation is accompanied by a slight shift to the right in the dose-response curve to glucagon for some metabolic actions, such as phosphorylase activation [3] or ureagenesis [2] in rat

hepatocytes from euthyroid animals. Interestingly, using hepatocytes from hypothyroid animals, we observed that PMA markedly inhibits the stimulation of ureagenesis by glucagon [4, 5]. These data prompted us to investigate (comparatively) the effect of this tumour promoter on glucagon actions, using hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats, in order to gain an insight into the reason(s) for such difference in sensitivity to PMA.

MATERIALS AND METHODS

Phorbol 12-myristate 13-acetate, 6-*N*-propyl-2-thiouracil, rotenone, methyl-isobutyl-xanthine (MIX), L-glutamine, L-ornithine, urease, glucose oxidase, peroxidase, dibutyryl cyclic AMP (But₂-cAMP) and Quin 2/AM were obtained from the Sigma Chemical Co. THG, (1-[*N*,*N*-trinitrophenyl]-histidine, 12-homoarginine]-glucagon), an analogue of glucagon, was synthesized and purified as described [6].

†Author to whom correspondence should be addressed at: Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 70 248, 04510 México D.F., México.

Abbreviations: But₂-cAMP dibutyryl cyclic adenosine 3', 5' monophosphate; MIX methyl isobutyl xanthine; PMA phorbol 12-myristate 13-acetate; THG (1-[*N*,*N*-trinitrophenyl]-histidine, 12-homoarginine]-glucagon; KRB Krebs Ringer bicarbonate buffer.

RESULTS

[³H]cAMP (32 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear, collagenase was from Worthington and DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid) was from Aldrich Chemical Co. Glucagon was a generous gift from Eli Lilly.

Experiments were performed with euthyroid and hypothyroid female Wistar rats (200–250 g) fed *ad libitum*. Hypothyroidism was induced by giving the animals water containing 0.03% propyl thiouracil for 40–50 days. Hypothyroidism was assessed by decreased weight gain, dryness of the fur and decreased levels of triiodothyronine [7].

Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend [8]. The cells (30–40 mg wet weight) were incubated in 1 ml of Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRB) under an atmosphere of 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4, at 37 °C in a water bath shaker.

To study urea production the cells were incubated in buffer supplemented with 2 mM ornithine and 10 mM glutamine for 60 min. Urea was quantified in the supernatants by the method of Gutman and Bergmeyer [9]. For the studies on glycogenolysis the cells were incubated for 60 min in 1 ml of KRB and glucose production was determined in the supernatants by method of Fales [10].

Citruiline synthesis was assayed in crude mitochondrial preparations obtained from hepatocytes previously incubated for 10 min with or without the agents. The mitochondrial preparations were obtained as described by Hensgens *et al.* [11]. Citruiline synthesis from glutamine was studied as described [12] and was determined by the method of Ceriotti and Gazaniga [13], as modified by Prescott and Jones [14].

Cyclic AMP was determined in medium plus cells by the method of Brown *et al.* [15]. In these experiments the cells were incubated for 2 min with the agents and 0.1 mM MIX to inhibit phosphodiesterase activity. The concentration of cytoplasmic free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) was studied using Quin 2 fluorescence [16, 17]. In brief, the cells were incubated in KRB without CaCl₂ containing 100 μM Quin 2-AM. The cells were incubated with the dye for 20 min, washed with the same buffer and resuspended in KRB without CaCl₂ containing 10 mM glucose and 20 mM HEPES, pH 7.4; this cell suspension was maintained on ice. An aliquot of the cell suspension was centrifuged, the supernatant discarded and the cells resuspended in KRB containing 10 mM glucose, 20 mM HEPES and 1.3 mM CaCl₂ at 37 °C, pH 7.4. The cells were preincubated for 3–5 min in the cuvette with continuous stirring, and fluorescence was then recorded (excitation 333 nm, emission 510 nm). THG reduced fluorescence, and this was taken into account in the calculations. Calculations of [Ca²⁺]_i were performed as described by Staddon and Hansford [17] for Quin 2-loaded hepatocytes.

In cells from euthyroid rats glucagon induced a dose-dependent increase in ureagenesis. The dose-response to glucagon was shifted to the right by 0.1 μM PMA (Fig. 1A).^{*} In cells from hypothyroid rats the effect of glucagon was much more markedly affected by PMA (Fig. 1B); the dose-response curve to glucagon was flattened and the response to the maximal concentration of glucagon used was greatly diminished. PMA, *per se*, was without effect on ureagenesis (data not shown, [18]).

Glucagon induced dose-dependent accumulations of cyclic AMP in cells from euthyroid and hypothyroid rats (Fig. 1C). The maximum accumulation was greater in cells from hypothyroid rats as compared to the controls, in agreement with previous findings [7]. PMA (0.1 μM) reduced the glucagon-induced accumulation of cyclic AMP similarly (≈ 50%) in hepatocytes from hypothyroid and euthyroid animals (Fig. 1C and D) and it was without any effect on basal cyclic AMP levels (data not shown).

In order to further characterize this difference we studied the effect of different concentrations of PMA on the stimulations of ureagenesis (Fig. 2A) and cyclic AMP accumulation (Fig. 2B) induced by a fixed concentration of glucagon. The data were normalized to the effect of glucagon alone (100%) in order to facilitate the comparison. It was observed that PMA inhibited glucagon-stimulated ureagenesis in cells from euthyroid rats only at relatively high concentrations (0.1–1 μM) but, in contrast, inhibition in hypothyroid rat cells occurred at concentrations as low as 100 pM. A dose-dependent inhibition was observed and the effect of 1 μM PMA was similar to that observed in cells from euthyroid rats (Fig. 2A). The inhibition by PMA of glucagon-induced cyclic AMP accumulation was also dose-depen-

^{*}The shift was slightly bigger than that previously reported [2], probably because a higher amount of DMSO (50%) was used in the serial dilutions of PMA, which prevents the phorbol ester from precipitating out of solution.

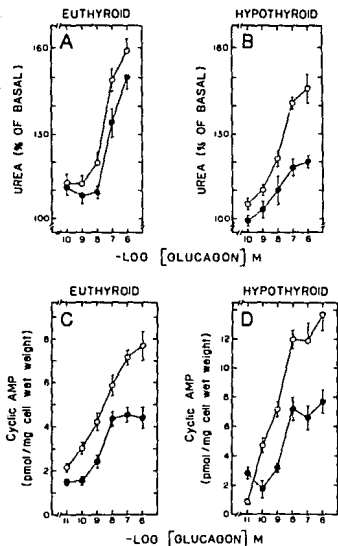


Fig. 1. Effect of PMA on glucagon-stimulated ureagenesis and cyclic-AMP accumulation in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. (A) and (B) Cells were incubated in the absence (open circles) or presence of $0.1 \mu\text{M}$ PMA (closed circles) and different concentrations of glucagon. Results are expressed as percentages of basal urea production which were 36 ± 3 and 45 ± 2 nmol/mg of cells wet weight for cells from euthyroid and hypothyroid rats, respectively. Plotted are the means, with the vertical lines representing the S.E.M. of 10-12 determinations using different cell preparations. (C) and (D) Cells were incubated in the absence (open circles) or presence of $0.1 \mu\text{M}$ PMA (closed circles) for 60 min and then challenged for 2 min with 0.1 mM MIX and different concentrations of glucagon. Basal cyclic AMP accumulations were 1.2 ± 0.4 and 1.4 ± 0.3 pmol/mg of cells wet weight. Plotted are the means, with the vertical lines representing the S.E.M. of 9-10 determinations using different cell preparations.

dent, and the apparent sensitivity was similar in cells from euthyroid rats as compared to those from hypothyroid rats (Fig. 2B).

It has been observed that the glucagon analogue (1-N α -trinitrophenyl-histidine, 12-homoarginine)-glucagon (THG) is capable of stimulating ureagenesis under conditions where no, or only a very small, accumulation of cyclic AMP is induced [19, 20]. We tested the effect of PMA on the action of this glucagon analogue. THG induced dose-dependent increases in ureagenesis both in cells from euthyroid and hypothyroid animals (Fig. 3), but the stimulation of ureagenesis in cells from hypothyroid rats was less marked (Fig. 3). Interestingly, PMA flattened the dose-response curve to THG in cells from euthyroid rats and completely blocked the action of the glucagon analogue in cells from hypothyroid animals (Fig. 3).

Dibutyryl cyclic AMP (But $_2$ -cAMP) induced dose-dependent stimulations of ureagenesis, no significant change in sensitivity was detected for hepatocytes obtained from euthyroid or from hypothyroid rats (data not shown, [7]). PMA diminished, in a dose-dependent manner, the effect of the cyclic nucleotide (Fig. 4); hepatocytes from hypothyroid animals were more sensitive to inhibition by the active phorbol ester (Fig. 4) than those from euthyroid rats. At high PMA concentrations (10^{-7} to 10^{-6} M) the inhibitions were essentially the same.

Ureagenesis is a biocompartmentalized pathway (mitochondria and cytosol). Thus, we next examined the effect of PMA on the actions of glucagon and But $_2$ -cAMP on glycogenolysis, a process that takes place exclusively in the cytosol. Two facts were observed in these studies; firstly, the effects of glucagon and But $_2$ -cAMP on glycogenolysis were only slightly inhibited by the phorbol ester (20-30% at the highest concentration of PMA tested); and secondly, no significant change in sensitivity between cells from hypothyroid and euthyroid rats was observed (Fig. 5).

The increase in ureagenesis induced by glucagon and other hormones involves an increased flux of NH $_3$ via glutaminase activation [21, 22]

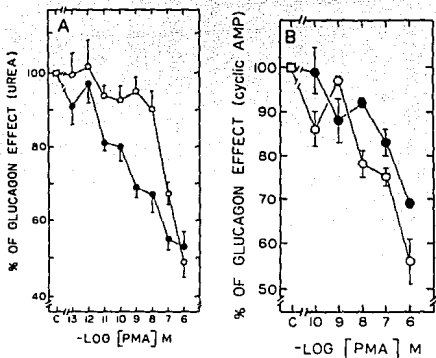


FIG. 2. Inhibition by PMA of glucagon-stimulated ureagenesis and cyclic AMP accumulation in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. (A) Cells from euthyroid (open circles) or hypothyroid (closed circles) rats were incubated with $1 \mu\text{M}$ glucagon and different concentrations of PMA. Results were normalized to the effect of glucagon alone (100%, C, square) which were 159 ± 4 and $151 \pm 4\%$ of basal ureagenesis, respectively. Basal urea production is given in the legend of Fig. 1. Plotted are the means, with vertical lines representing the S.E.M. of 8-10 determinations using different cell preparations. (B) Cells from euthyroid (open circles) or hypothyroid (closed circles) rats were incubated for 60 min with different concentrations of PMA and then challenged for the last 2 min with 0.1 mM MIX and $0.1 \mu\text{M}$ glucagon. Results were normalized to the effects of glucagon alone in cells incubated in the absence of PMA (100% C) which were 7.9 ± 0.30 and $9.7 \pm 0.4 \text{ pmol/mg}$ of cells wet weight. Plotted are the means, with the vertical lines representing the S.E.M. of 10-12 determinations using different cell preparations.

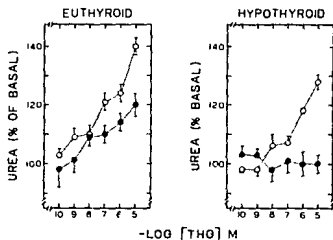


FIG. 3. Effect of PMA on THG-stimulated ureagenesis in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. Cells were incubated in the absence (open circles) or presence of $0.1 \mu\text{M}$ PMA (closed circles) and different concentrations of THG. Other indications are as in Fig. 1 (A) and (B).

and an increase in citrulline production [12, 23-25]; both processes take place in the mitochondria and it has been shown that mitochondria isolated from cells treated with the hormones retain an increased rate of citrulline synthesis [12, 23, 25 (and references therein)]. Thus, we next examined the action of PMA on this effect. Cells were treated with maximally effective concentrations of glucagon, THG or But₂-cAMP in the absence or presence of PMA; a crude mitochondrial preparation was obtained and citrulline synthesis was assayed. The three agents (glucagon, THG and But₂-cAMP) consistently increased citrulline production, independently of the thyroid state of the donor animal. In cells from hypothyroid animals THG was less effective than glucagon or But₂-cAMP (Fig. 6). PMA decreased the stimulation induced by glu-

Effect of hypothyroidism on the modulation of glucagon actions by PMA

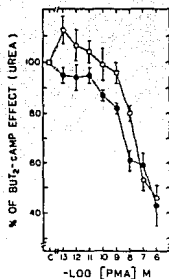


Fig. 4. Effect of PMA on dibutyryl cyclic AMP-stimulated ureagenesis in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. Cells from euthyroid (open circles) or hypothyroid (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM But₂-cAMP and different concentrations of PMA. Results were normalized to the effects of But₂-cAMP in cells incubated without PMA (100%, C, square) which were 171 ± 3 and $174 \pm 6\%$ of basal ureagenesis. Other indications are as in Fig. 1 (A) and (B).

glucagon in cells from both euthyroid and hypothyroid animals. The effect of THG was markedly diminished by PMA in the euthyroid state and practically abolished in hypothyroidism. In cells from hypothyroid rats PMA clearly diminished the effect of But₂-cAMP whereas, in cells from euthyroid rats, the effect of PMA was statistically insignificant.

Mobilization of intracellular calcium and increases in cytosol Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) have been implicated in the action of glucagon [16, 20, 26-35]. We observed that glucagon induced 2-3-fold increases in [Ca²⁺]_i (typical tracings are shown in Fig. 7A). The effect of glucagon was dose-dependent (Fig. 7B and C), and it was smaller in cells from hypothyroid animals than in the controls. PMA (0.1 μM) significantly reduced the effect of glucagon in the control cells and completely abolished the effect of the peptide hormone in cells from hypothyroid rats. In cells from euthyroid animals 10⁻⁶ M glucagon induced a 2-fold increase in [Ca²⁺]_i which was reduced by PMA; glucagon-induced

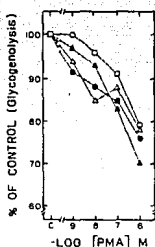


Fig. 5. Effect of PMA on the stimulations of glycogenolysis induced by glucagon and dibutyryl cyclic AMP in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. Cells from euthyroid (open symbols) or hypothyroid rats (closed symbols) were incubated with 1 μM glucagon (triangles) or 0.1 mM But₂-cAMP (circles) and different concentrations of PMA. Results were normalized to the effects of glucagon and But₂-cAMP (100, C, square) which were 258 ± 14 and $197 \pm 12\%$ of basals for glucagon and 217 ± 17 and $193 \pm 12\%$ of basals for But₂-cAMP, in cells from euthyroid and hypothyroid rats, respectively. Basal glycogenolysis were 38 ± 4 and 47 ± 5 nmol/mg cells wet weight for cells from euthyroid and hypothyroid rats, respectively. Plotted, are the means of 6-7 experiments using different cell preparations; S.E.M. was 5-10% of the means and were omitted for clarity.

increases in [Ca²⁺]_i of a similar magnitude were completely abolished by PMA in cells obtained from hypothyroid rats. Similarly, the effect of But₂-cAMP on this parameter was diminished by PMA in control cells and abolished in cells from hypothyroid animals (Fig. 8). THG was also able to increase [Ca²⁺]_i; PMA blocked its effect in cell preparations from euthyroid or hypothyroid animals (Fig. 8); at this concentration of THG (10⁻⁶ M) we observed ≈ 2-fold increases in cyclic AMP accumulation which were decreased 50% by PMA using cells from euthyroid or hypothyroid rats.

DISCUSSION

Active phorbol esters, such as PMA, diminish the hormonal activation of adenylate cyc-

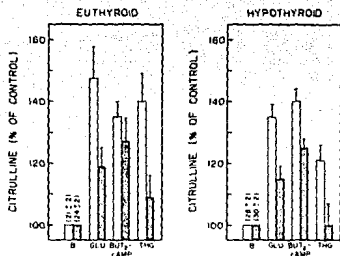


Fig. 6. Effect of PMA on the stimulations of citrulline production induced by glucagon, THG and dibutyryl cyclic AMP in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. Cells were incubated for 10 min. the agents indicated in the abscissa, B (basal, no agent); GLU, (glucagon 1 μ M); 0.1 mM Buty-cAMP or 10 μ M THG in the absence (open bars) or presence of 0.1 μ M PMA (dashed bars). After this incubation the cells were disrupted, a crude mitochondrial preparation obtained and citrulline production assayed. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 6-10 determinations using different cell preparations. Results were normalized to the basal production which is given on the top of the B-bars and are expressed as nmol/mg protein, 10 min.

lase in hepatocytes [1-15]. This effect of phorbol esters is observed (diminution of glucagon-stimulated cyclic AMP accumulation) in cells from euthyroid and hypothyroid rats. The magnitude of the effect and the sensitivity of the hepatocytes was not greatly altered by the thyroid status of the donor animal. However, bypassing the adenylate cyclase system by using Buty-cAMP revealed that the stimulation of ureagenesis by this agent is also altered by PMA. Therefore, these results indicate that the diminution in glucagon-mediated cyclic AMP accumulation is not the sole mechanism through which PMA alters the metabolic effects of the peptide hormone and that the action of the second messenger cyclic AMP is also affected.

Interestingly, the glycogenolytic action of glucagon was much less affected by PMA than

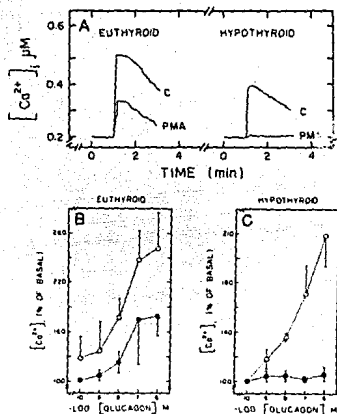


Fig. 7. Effect of PMA on the increases in cytoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ induced by glucagon in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. (A) Hepatocytes were pre-equilibrated in the fluorimeter cell for 4-5 min, PMA or vehicle were added 2-3 min before 10 μ M glucagon. Tracings are representative of those obtained in 3-5 preparations. (B) Cells were incubated in the absence (open circles) or presence of 0.1 μ M PMA (closed circles) and different concentrations of glucagon. Results are expressed as per cent of basal $[Ca^{2+}]_i$, which were 206 ± 15 and 248 ± 18 nM in cells from euthyroid and hypothyroid rats, respectively. Plotted are the means, with the vertical lines representing the S.E.M. of 3-5 determinations using different cell preparations.

was its effect on ureagenesis. The fact that ureagenesis takes place in both cytosol and mitochondria, whereas glycogenolysis is exclusively cytoplasmic, suggested that PMA inhibited to a greater extent the hormone effects on mitochondrial. Further support for this possibility was obtained in the experiments on citrulline production by mitochondria. Previously, Staddon and Hansford [34] reported that glucagon increased the amount of active pyruvate dehydrogenase (a mitochondrial enzyme) and inactivated pyruvate kinase (cytoplasmic);

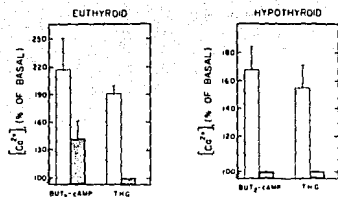


Fig. 8. Effect of PMA on the increases in cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ induced by THG and dibutyl cyclic AMP in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. Cells were incubated in the absence (open bars) or presence of $0.1 \mu M$ PMA (dashed bars) and with $0.1 mM$ But₂-cAMP or $10 \mu M$ THG. Where no vertical lines are presented no change in fluorescence was observed in any of the experiments. Other indications are as in Fig. 7.

PMA blocked the stimulation of pyruvate dehydrogenase by glucagon but had no effect on glucagon-induced inactivation of pyruvate kinase. Our data, and those of other authors [34], are consistent, and suggest that the hormone influences mitochondrial and cytoplasmic metabolism through different mechanisms.

The increase in cyclic AMP accumulation, and the subsequent activation of protein kinase A, induced by glucagon seems to be sufficient [but does not exclude role(s) of other factor(s)] to explain its effects on cytoplasmic metabolism. The mechanism(s) through which this hormone modulates mitochondrial metabolism is (are) much more obscure. A calcium role in the mitochondrial actions of glucagon has been suggested. Glucagon-induced changes in $[Ca^{2+}]$ were observed in this study, and previously by several authors [16, 17, 19, 26–35]. PMA is able to diminish this effect [this study, 17, 29].

It has been suggested that the activation of pyruvate dehydrogenase induced by glucagon and other hormones may be mediated by an increase in mitochondrial $[Ca^{2+}]$, secondary to increases in cytosol $[Ca^{2+}]$ [36–38]. We observed that the glucagon-induced increases in ureagenesis and citrulline production seem to be more related to the changes in $[Ca^{2+}]$ than to

those in cyclic AMP accumulation. However, some differences exist, for example, in cells from hypothyroid rats PMA abolished the glucagon effect on $[Ca^{2+}]$, whereas it markedly diminished (but did not abolish) the effect of the hormone on ureagenesis or citrulline synthesis. In addition, the effect of PMA on glucagon-stimulated citrulline synthesis was not altered by the thyroid status of the animals; only its effect on the actions of THG and But₂-cAMP was more marked in hypothyroidism. The methodological differences required for these studies makes it difficult to establish direct relationships. We previously observed that calcium-depletion of hepatocytes markedly decreased mitochondrial glutaminase activity and reduced the stimulatory effect of glucagon [22]. Similarly, the glucagon-induced stimulation of mitochondrial citrulline production is markedly diminished if calcium-depleted cells are used [12]. Recently Johnston and Brand [39] reported that submicromolar concentrations of extramitochondrial $[Ca^{2+}]$ stimulate the rate of citrulline synthesis by rat liver mitochondria. However, factors other than calcium also regulate citrulline synthesis [26, 37, 39].

The ability of glucagon, THG and But₂-cAMP to elevate $[Ca^{2+}]$, was decreased in hepatocytes obtained from hypothyroid rats as compared to the controls. This is consistent with the fact that liver cells from hypothyroid animals have defective calcium-handling mechanisms [7, 40]. The processes that control $[Ca^{2+}]$ are complex and involve calcium mobilization from non-mitochondrial and mitochondrial stores, and influx and efflux through the plasma membrane. It is not known what changes occur during hypothyroidism to affect these controls. Nevertheless, it has been observed that calcium efflux induced by hormones in livers, perfused with medium containing a low calcium concentration, was decreased by more than 50% in hypothyroidism [40]. Furthermore, PMA attenuated the ability of glucagon, THG and But₂-cAMP to increase $[Ca^{2+}]$, much more markedly in cells from hypothyroid rats than in the controls. The possibility that the general cell sensitivity to PMA could be altered in liver cells

obtained from hypothyroid animals was considered. However, several data argue against it. Firstly, the ability of PMA to diminish glucagon-stimulated cyclic-AMP accumulation was similar in hypothyroidism as compared to the controls. On the other hand, we tested an independent parameter, the ability of PMA to block alpha₁-adrenergic action in hepatocytes [18] (assayed as phosphatidylinositol resynthesis [41]), and observed that it was identical in magnitude and sensitivity in cells from euthyroid and hypothyroid rats (data not shown). Therefore, the increased sensitivity of some glucagon-effect to PMA in hepatocytes from hypothyroid rats seems to result from the action of active phorbol esters (putatively via PK-C activation) on an already defective process (i.e. the regulation of calcium cytotaxis).

Acknowledgements The authors thank Dr A. Peña for letting them use his fluorimeter and Mrs GUADALUPE RAMÍREZ for skillfully typing the manuscript. This research was partially supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (ICEXCNA 060394), The Third World Academy of Sciences (TWAS RGBC 88-93), Fundación Miguel Alemán and the U.S. Public Health Service (DK 21085).

REFERENCES

- Heyworth C. M., Whetton A. D., Kinsella A. R. and Houslay M. D. (1984) *FEBS Lett.* **170**, 38-42.
- García-Sáinz J. A., Mendlovic F. and Martínez-Olmedo M. A. (1985) *Biochem. J.* **228**, 277-280.
- Lynch C. J., Charest R., Boeckino S. B., Exton J. H. and Blackmore P. F. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2844-2851.
- Hernández-Sotomayor S. M. T., Macías-Silva M., Plebanski M. and García-Sáinz J. A. (1988) *Biochim. biophys. Acta* **972**, 311-319.
- García-Sáinz J. A., Hernández-Sotomayor S. M. T., Contreras-Rodríguez J. L. and Macías-Silva M. (1989) *Biochem. Int.* **18**, 243-249.
- Bregman M. D., Trivedi D. and Hruby V. J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 11725-11731.
- Corvera S., Hernández-Sotomayor S. M. T. and García-Sáinz J. A. (1984) *Biochim. biophys. Acta* **803**, 95-105.
- Berry M. N. and Friend D. S. (1969) *J. Cell Biol.* **43**, 506-520.
- Gutman I. and Bergmeyer H. U. (1974) In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4 (Bergmeyer H. U., Ed). Academic Press, New York, 1791-1793.
- Fales F. W. (1963) *Stand. Meth. Clin. Chem.* **4**, 101-112.
- Hensgens H. E. S. J., Verhoeven A. J. and Meijer A. J. (1980) *Eur. J. Biochem.* **107**, 197-205.
- Corvera S. and García-Sáinz J. A. (1982) *Life Sci.* **31**, 2493-2498.
- Cerriotti G. and Gazaniga A. (1967) *Clin. chim. Acta* **16**, 436-440.
- Prescott L. M. and Jones M. E. (1969) *Analyt. Biochem.* **32**, 408-419.
- Brown B. L., Albano J. D. M., Ekins P. and Sgherzi A. M. (1971) *Biochem. J.* **121**, 561-562.
- Charest R., Blackmore P. F., Berthon B. and Exton J. H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8769-8773.
- Staddon J. M. and Hansford R. G. (1986) *Biochem. J.* **238**, 737-743.
- Corvera S. and García-Sáinz J. A. (1984) *Biochem. biophys. Res. Commun.* **119**, 1128-1133.
- Corvera S., Huerta-Bahena J., Pelton J. T., Hruby V. J., Trivedi D. and García-Sáinz J. A. (1984) *Biochim. biophys. Acta* **84**, 434-441.
- Wakelam M. J. O., Murphy G. J., Hruby V. J. and Houslay M. D. (1986) *Nature* **323**, 68-71.
- Lacey J. H., Bradford N. M., Joseph S. K. and McGivan J. D. (1981) *Biochem. J.* **194**, 29-33.
- Corvera S. and García-Sáinz J. A. (1985) *Biochem. J.* **210**, 957-960.
- Titheradge M. A. and Haynes R. C. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **201**, 44-55.
- Siess E. A., Fahimi F. M. and Wieland, O. H. (1981) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 1643-1651.
- Verhoeven A. J., Hensgens H. E. S. J., Meijer A. J. and Tager J. M. (1982) *FEBS Lett.* **140**, 270-272.
- Hagopian W. A. and Tager H. S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15506-15513.
- Grady T., Fickova M. and Tager H. S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15514-15520.
- Mine T., Kojima I. and Ogata E. (1988) *Biochim. biophys. Acta* **970**, 166-171.
- Blackmore P. F. and Exton J. H. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11056-11063.
- Sistare F. D., Pickering R. A. and Haynes R. C. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 12744-12747.
- Lotersztajn S., Epand R., Mallat A., Pavoine C. and Pecker F. (1985) *Biochimie* **67**, 1169-1176.
- Poggioli J., Mauger J.-P. and Claret M. (1986) *Biochem. J.* **663**, 669.
- Mauger J.-P. and Claret M. (1986) *FEBS Lett.* **195**, 106-110.

Effect of hypothyroidism on the modulation of glucagon actions by PMA

34. Staddon J. M. and Hansford R. G. (1987) *Biochem. J.* **241**, 729-735.
35. Staddon J. M. and Hansford R. G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179**, 47-52.
36. McCormack J. G. and Denton R. M. (1986) *Trends. Biochem. Sci.* **11**, 258-262.
37. McCormack J. G. (1985) *Biochem. J.* **231**, 597-608.
38. Assimacopoulos-Jeannet F., McCormack J. G. and Jeanrenaud B. (1986) *J. biol. Chem.* **261**, 8799-8804.
39. Johnston J. D. and Brand M. D. (1989) *Biochem. J.* **257**, 285-288.
40. Storm H. and van Hardeveld C. (1986) *Biochim. biophys. Acta* **885**, 206-215.
41. Corvera S., Schwarz K. R., Graham R. M. and Garcia-Sáinz J. A. (1986) *J. biol. Chem.* **261**, 520-526.

Modulation of G_s activity by phorbol myristate acetate in rat hepatocytes

S. M. TERESA HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, MARINA MACÍAS-SILVA, CRAIG C. MALBON, AND J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México; and Department of Pharmacological Sciences, School of Medicine, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York 11794-8651

HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S. M., TERESA, MARINA MACÍAS-SILVA, CRAIG C. MALBON, AND J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ. Modulation of G_s activity by phorbol myristate acetate in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 260 (Cell Physiol. 29): C259-C265, 1991.—Activation of protein kinase C promotes heterologous desensitization of hepatic adenylate cyclase. The basis for this desensitization was explored by use of a strategy with several independent approaches. Although not influencing the amount of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity (catalyst), treatment with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) decreased adenylate cyclase activation in response to either sodium fluoride or guanylyl imidodiphosphate [Gpp(NH)p]. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) accumulation in cholera toxin-treated hepatocytes and both the basal and GTP-stimulated adenylate cyclase activity of membranes from toxin-treated cells displayed a marked reduction in response to PMA. The ability of cholera extracts of hepatocyte membranes to reconstitute β -adrenergic-stimulated adenylate cyclase activity of membrane of S49 mouse lymphoma cyc^+ cells was reduced by treatment with PMA. Cholera toxin-catalyzed labeling of G_s -subunits was likewise diminished by phorbol ester treatment. Immunoblots of membranes from control or PMA-treated hepatocytes showed no difference in the amount of G_s . Immunoprecipitation studies failed to detect phosphorylation of this G protein α -subunit. The data demonstrate that PMA induces an alteration in the functional status of G_s without altering the amount of this transmembrane signaling element. The alteration in G_s function may play a significant role in heterologous desensitization.

phorbol esters; desensitization; guanine nucleotide-binding proteins

EXPOSURE OF CELLS to agonists usually results in decreased responsiveness to subsequent stimuli. This adaptive process, known as desensitization, may involve alterations at one or more of the elements constituting transmembrane signaling. Cell-surface receptors, coupling proteins (such as the G proteins), and membrane effectors (adenylate cyclase, ion channels) constitute transmembrane signaling devices, whereas intracellular elements (protein kinases and other enzymes) propagate the signal within the cell. Identification of the sites affected by desensitization is critical to our developing a biochemical understanding of the phenomenon and an approach to the therapeutic consequences of desensitization.

The adenylate cyclase system is one of the best char-

acterized transmembrane signaling devices and has been used frequently as a model for study of desensitization. Chronic stimulation by agonists often leads to a general attenuation of the responsiveness of adenylate cyclase to further stimulation by a variety of different hormones as well as by guanine nucleotides and fluoride ions (1, 5, 6, 13, 18, 31, 39). This phenomenon has been operationally defined as heterologous desensitization. In homologous desensitization, alteration in the response to agonist is confined exclusively to subsequent stimulation by the agent (1, 6, 13, 18, 31, 39). Protein kinases have been implicated as participants in both of these processes (1, 6, 13, 18, 31, 39).

Phorbol esters, such as phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), are well-known activators of the calcium- and phospholipid-dependent protein kinase protein kinase C (PKC) (5). Depending on the cell type, phorbol ester effects on the adenylate cyclase system can be quite distinct. In duck and turkey erythrocytes, for example, active phorbol esters promote β -adrenergic receptor phosphorylation and desensitization of adenylate cyclase (20, 36), whereas in frog erythrocytes, phorbol esters induce phosphorylation of the catalytic subunit of adenylate cyclase, enhancing β -adrenergic-, GTP-, and NaF-stimulated adenylate cyclase activities (41).

In hepatocytes, activation of PKC by phorbol esters or by hormones that promote phosphoinositide turnover leads to a decrease in both glucagon- and β -adrenergic-stimulated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) accumulation (8, 10, 15, 17, 23, 30), i.e., to heterologous desensitization of adenylate cyclase. Using membranes from cells treated with phorbol esters, we observed a decrease in the stimulation of adenylate cyclase by isoproterenol plus GTP, by glucagon plus GTP, or by guanylyl imidodiphosphate [Gpp(NH)p] alone (15). This decreased response appears to result from activation of PKC (15). Forskolin-stimulated adenylate cyclase activity, in contrast, was unaltered in membranes from cells treated with phorbol esters (15).

This paper provides compelling evidence for an alteration of G_s function as the basis for in PMA-induced heterologous desensitization of adenylate cyclase in hepatocytes.

MATERIALS AND METHODS

PMA, 6-*n*-propyl-2-thiouracil, 3-isobutyl-1-methylxanthine, GTP, Gpp(NH)p, NaF, theophylline, ATP,

phosphocreatine, creatine kinase, cholera toxin, arginine, thymidine, NAD⁺, NADP⁺, dithiothreitol, trizma, EDTA, N-ethylmaleimide, β -mercaptoethanol, leupeptin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Sigma Chemical. Forskolin was obtained from Calbiochem. [³H]cAMP (32 Ci/mmol), [³H]ATP (28.7 Ci/mmol), [³H]GTP (carrier free), and [α -³²P]NAD⁺ (800 Ci/mmol) were obtained from Du Pont-New England Nuclear. The anti-G_o antiserum (no. 129R) used in this study was generously donated by Dr. Allen Spiegel (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). This antiserum was produced against the COOH-terminal decapeptide of G_o, and its high selectivity has been shown (37, 38). Affinity-purified goat anti-rabbit immunoglobulin G conjugated to alkaline phosphatase and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate were obtained from Bio-Rad. Protein A-Sepharose and Percoll were from Pharmacia.

Female Wistar rats (~200–250 g) fed ad libitum were used. Animals were maintained and used in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and the Regulation of the Health Department. Previous studies (7, 8, 15, 24, 26) employed hypothyroid rats to provide a robust responsiveness to stimulation by glucagon and β -adrenergic agonists (7, 8, 11, 15, 24, 26). Hypothyroid animals were used in the present study for the same purpose and to provide a comparison to the earlier studies. Hypothyroidism was induced by maintaining the animals with water containing 0.03% 6-n-propyl-2-thiouracil for 40–50 days. Hypothyroid status was established by decreased weight gain, dryness of the fur, and decreased levels of triiodothyronine (7).

Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (2). cAMP accumulation was determined by the method of Brown et al. (3) in cells incubated in 1 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer under an atmosphere of 95% O₂-5% CO₂ (pH 7.4) at 37°C in a water-bath shaker. PMA induces a heterologous desensitization of adenylate cyclase in whole cells (cAMP accumulation) and in isolated membranes (adenylate cyclase activity) (15). The effect of PMA has been shown to be time and dose dependent (15). Near-maximal effect of 1 μ M PMA is observed within 15 min after addition to cells (15). These conditions were selected for the present studies.

Membranes were isolated from hepatocytes by a modification (15) of the method of Loten and Redshaw-Loten (2). Adenylate cyclase activity was assayed in a mixture containing 25 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris; pH 7.5), 0.4 mM ATP (containing 1.2 \times 10⁶ counts/min [α -³²P]ATP), 5 mM MgCl₂, 10 mM theophylline, 7.4 mg/ml phosphocreatine, and 1 mg/ml creatine kinase. The reaction was initiated by the addition of an aliquot of membrane fraction (~150 μ g protein) to a total volume of 0.1 ml and was conducted at 30°C for 20 min. cAMP was isolated as described by Salomon et al. (35). Protein was quantified by the method of Lowry et al. (22), using bovine serum albumin as the standard.

Cholera toxin was activated with 20 mM dithiothreitol for 10 min at 37°C. To assay the toxin-catalyzed ADP

ribosylation, membranes (50 μ g of protein) were incubated for 60 min at 30°C in a final volume of 0.1 ml containing 250 mM potassium phosphate (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 10 mM arginine, 10 mM thymidine, 1.0 mM ATP, 0.1 mM GTP, 10 μ M NAD⁺ (containing 10 μ Ci [α -³²P]-NAD⁺ per tube), and the activated toxin (0.1 mg/ml). The ADP-ribosylation reactions were terminated by addition of 1 ml of ice-cold 250 mM phosphate buffer. The membranes were collected by centrifugation in a microfuge, solubilized in SDS, and subjected to electrophoresis on 10% acrylamide gels in the presence of 0.1% SDS. The gels were fixed, dried, and exposed to X-ray film for 3 days. Densitometric analysis of the autoradiograms was made in a Beckman DU-6 spectrophotometer.

The activity of G_o was also assayed by reconstitution experiments. For the assays of G_o activity, hepatocyte membranes (8 mg/ml) were extracted with 1% (wt/vol) cholate, and G_o activity in the extract was assessed by its ability to complement hormone-sensitive adenylate cyclase activity in membranes of S49 cyc⁻ mouse lymphoma cells that lack G_o; adenylate cyclase activity was assayed in the presence of 0.1 mM isoproterenol and 0.1 mM Gpp(NH)p at several different dilutions of the extract, since cholate has been shown to inhibit the catalyst (9, 25).

Immunoblots were performed by standard methods (14) using a secondary antibody coupled to alkaline phosphatase and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate as substrate. Immunoprecipitation of G_o was performed as follows: 100 μ g of membrane protein were solubilized with 800 μ g SDS in 200 μ l of the following buffer: 10 μ g/ml aprotinin, 100 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 0.5 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 150 mM NaCl, and 50 mM Tris adjusted to pH 7.4. The sample was centrifuged at 11,600 g for 10 min and the pellet discarded. An aliquot (~2.5 μ l) of the antiserum plus 40 μ l of 10% Triton X-100 were added to the supernatant, and the mixture was incubated overnight on a rotator at 4°C. After the addition of protein A-Sepharose and further incubation for 2 h at 4°C, the sample was washed twice with 600 mM NaCl and 50 mM Tris, pH 8.3, containing Triton X-100, SDS, and the protease inhibitors, at the same concentrations as above. A final wash with 150 mM NaCl and 50 mM Tris, pH 7.4, also containing the protease inhibitors was performed before the sample was subjected to electrophoresis.

RESULTS

Basal adenylate cyclase activities were equivalent in membranes from control or PMA-treated hepatocytes [5.43 \pm 0.57 vs. 5.24 \pm 0.84 (SE) pmol \cdot min⁻¹ \cdot mg protein⁻¹, $n = 5$ in each case, $P > 0.8$]. Gpp(NH)p, a hydrolysis-resistant analogue of GTP, stimulated adenylate cyclase in a dose-dependent fashion (Fig. 1A). In membranes from control and PMA-treated cells the 50% effective concentration values (EC₅₀) for the activation of adenylate cyclase by Gpp(NH)p were identical (~3 μ M) (Fig. 1A). Striking was the difference in the maximal responses between treated and untreated cells. In membranes of untreated cells, Gpp(NH)p (10⁻⁴ M) stimulated 450% basal activity, whereas in membranes from PMA-

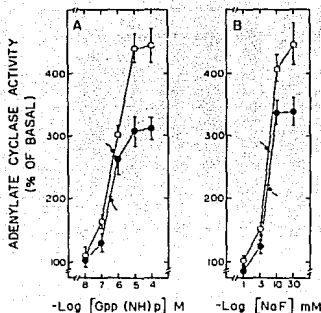


FIG. 1. Adenylate cyclase activity of membranes from control and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treated hepatocytes: response to guanylyl imidodiphosphate [Gpp(NH)p] and NaF. Hepatocytes were incubated for 15 min in the absence (○) or presence (●) of 1 μ M PMA. Cells were extensively washed, membranes were prepared, and adenylate cyclase activity was assayed in the presence of either Gpp(NH)p (A) or NaF (B). Data are expressed as the percentage of basal. Basal adenylate cyclase activities were 5.34 ± 0.57 and 5.24 ± 0.84 pmol min^{-1} mg protein $^{-1}$ in membranes from control and PMA-treated cells, respectively. Plotted are means, and vertical lines represent SE of triplicate determinations of 3 different membrane preparations.

treated cells the maximal effect was only 300% of basal. Thus PMA treatment promoted a significant ($P < 0.001$) decrease in the maximal response to Gpp(NH)p. NaF-stimulated adenylate cyclase activity was reduced in membranes from PMA-treated as compared with control cells (Fig. 1B); this difference in maximal effect was significant ($P < 0.02$). Forskolin-stimulated adenylate cyclase activity, in contrast, was identical in membranes from control or PMA-treated cells ($1,000 \pm 100$ vs. $1,100 \pm 100\%$ of basal activities, respectively; $n = 4$).

Cholera toxin catalyzes an NAD $^{+}$ -dependent ADP-ribosylation of G α (12). This covalent modification of G α reduces its intrinsic GTPase activity (12), promoting a persistent activation of G α and thereby of adenylate cyclase. Incubation of hepatocytes with cholera toxin stimulated cAMP accumulation after a lag of ~ 10 min (Fig. 2A). Maximal cAMP accumulation in toxin-treated cells was observed at 60 min (Fig. 2A). When cells were treated with 1 μ M PMA and cholera toxin in combination, the time course of cAMP accumulation was nearly identical to that for cells treated with toxin alone. The accumulation of cAMP, in contrast, was decreased ~ 40 –50% in PMA-treated as compared with control cells ($P < 0.001$; Fig. 2A). PMA (1 μ M) alone does not alter the basal level of cAMP (10, 15). Incubations for >60 min resulted in lower levels of cAMP in both control and cholera toxin-treated cells.

Adenylate cyclase activity of membrane fractions was assayed. In membranes from untreated cells GTP (100 μ M) increased basal adenylate cyclase activity $\sim 50\%$. Forskolin (100 μ M) stimulated 1,000–1,200% basal activ-

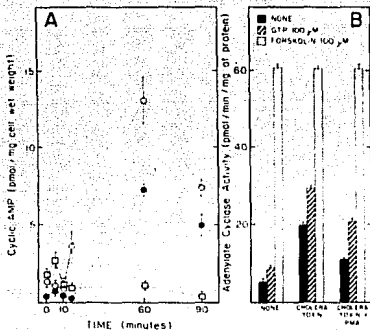


FIG. 2. cAMP accumulation and adenylate cyclase activity of control and PMA-treated hepatocytes: effects of cholera toxin. A: Hepatocytes were preincubated for times indicated without any agent (○), with 1 μ g/ml cholera toxin (●), or with 1 μ g/ml cholera toxin + 1 μ M PMA (●) in the presence of 100 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine. Plotted are means, and vertical lines represent SE for triplicate determinations using 3 different cell preparations. B: Hepatocytes were preincubated for 60 min under conditions described above. Membranes were prepared, and basal (closed bars), 100 μ M GTP-stimulated (dashed bars), or 100 μ M forskolin-stimulated (open bars) adenylate cyclase activity was assayed. Plotted are means, and vertical lines represent SE of triplicate determinations of 8–10 different membrane preparations.

ity (Fig. 2B). Membranes from cholera toxin-treated cells showed increased basal and GTP-stimulated activities as compared with control membranes (Fig. 2B). Membranes from cells treated with PMA plus cholera toxin also had increased basal and GTP-stimulated activities as compared with control membranes. These increases were of smaller magnitude, however, than those observed in membranes of cells treated with toxin only. There was a consistent and significant ($P < 0.02$) cholera toxin vs. cholera toxin + PMA decrease in basal and GTP-stimulated adenylate cyclase activities induced by PMA (Fig. 2). Forskolin-stimulated cyclase activity, in sharp contrast, was identical in membranes from control, cholera toxin-treated, and cholera toxin + PMA-treated cells (Fig. 2B).

The functional status of G α in untreated vs. PMA-treated cells was explored by reconstitution experiments. The ability of cholera extracts of liver membranes (from control or PMA-treated cells) to reconstitute isoproterenol-stimulated adenylate cyclase activity in membranes of S49 cyc mouse lymphoma mutant cells was determined (Table 1). Extracts from membranes of PMA-treated cells reconstituted only 40–50% of the adenylate cyclase activity generated by extracts from control cells. This reduced ability of extracts from membranes of PMA-treated cells to reconstitute adenylate cyclase activity was observed with undiluted cholera extracts as well as with samples in which the extract was diluted 1:1 (Table 1) or further (data not shown).

TABLE 1. Reconstitution of adenylate cyclase activity of membranes of S-49 *cyc*⁻ cells by cholera extracts of membranes prepared from hepatocytes preincubated with or without PMA

| Source of Extract | Adenylate Cyclase Activity, pmol cAMP/mg membrane protein | |
|--------------------------------------|--|----------------------------|
| | No dilution of extract | 1:1 Dilution of extract |
| Membranes from control cells | 19.4 ± 2.0 | 30.0 ± 6.0 |
| Membranes from PMA- treated cells | 12.0 ± 1.0* | 14.8 ± 2.8† |

Values are means ± SE of quadruplicate determinations of 5 different experiments. PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate. Adenylate cyclase activity of *cyc*⁻ membranes alone was 3.7 ± 0.3 pmol cAMP/mg membrane protein. * $P < 0.005$; † $P < 0.025$.

Bacterial toxin-catalyzed ADP ribosylation of membranes in the presence of [³²P]NAD provides structural information on G protein α -subunits. Figure 3 is a representative autoradiogram of the ADP-ribosylation studies using cholera toxin. Cholera toxin catalyzed the ADP ribosylation of three peptides: a major labeled peptide of $M_r \sim 42,000$ and a doublet of $M_r \sim 46,000$ - $48,000$ (Fig. 3). This pattern of labeling was not altered in membranes from PMA-treated as compared with untreated hepatocytes. The amount of labeling of G_i α was reduced in membranes from PMA-treated cells. Densitometric analysis of the autoradiograms (Fig. 3) showed that PMA treatment reduced $\sim 25\%$ the cholera toxin-catalyzed labeling of the 42,000 peptide and $\sim 40\%$ of that in the 46,000/48,000 doublet (average of 7 experiments using different membrane preparations).

When membranes were subjected to immunoblotting using the specific anti-G_i α antiserum, two major bands were clearly observed (Fig. 4) of the expected M_r ($\sim 42,000$ and $\sim 48,000$). Two other bands of M_r 32,000 and 30,000 were observed, but the labeling was much less intense. When nonimmune serum was employed only the two bands of lower M_r were slightly labeled. This indicates the specificity of the antiserum. No difference in the amount of immunoreactive G_i α was observed between membranes from control or PMA-treated cells when identical amounts of protein were subjected to immunoblotting and staining with anti-G_i α antiserum (Fig. 4).

Immunoprecipitation of G_i α was attempted using the specific antipeptide antiserum. As shown in Fig. 5A, this antiserum immunoprecipitates radiolabeled (ADP-ribosylated) G_i α . Immunoprecipitation of labeled protein was not evident when nonimmune serum was used. These data further support the specificity of the antibody and validate the immunoprecipitation protocol.

In other series of experiments we explored whether PMA was stimulating phosphorylation of G_i α . For this purpose hepatocytes were incubated in buffer supplemented with 1 or 10 mCi/ml [³²P]P_i for 90 min to achieve a steady-state level of the specific activity of the ATP pool. Cells were then further incubated for 15 min without or with 1 μ M PMA. Membranes were isolated from labeled cells and G_i immunoprecipitated. It can be observed in Fig. 5B that even though there was substantial incorporation of label into membrane proteins, no la-

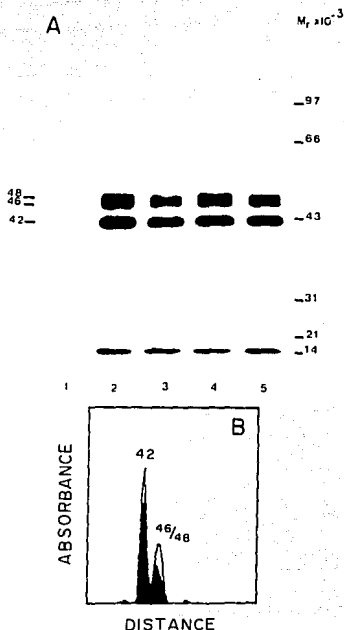


FIG. 3. Analysis of radiolabeled products resulting from cholera toxin-catalyzed ADP ribosylation of membranes obtained from control or PMA-treated hepatocytes. A: membranes from control (lanes 1, 2, and 4) or PMA-treated hepatocytes (lanes 3 and 5) (50 μ g protein) were incubated with the ADP-ribosylation mixture and activated cholera toxin (0.1 mg/ml) (lanes 2, 3) or vehicle (lane 5). Autoradiogram is representative of 7 separate experiments performed under identical circumstances. B: densitometric scanning of autoradiogram. Open tracing, control membranes; and closed tracing, membranes from PMA-treated hepatocytes.

beled protein was immunoprecipitated by the anti-G_i α antiserum. Immunoprecipitations conducted in the presence of phosphatase inhibitors (0.1 mM sodium vanadate, 10 mM sodium pyrophosphate, and 25 mM β -glycerophosphate), too, displayed no evidence for G_i α phosphorylation (not shown).

DISCUSSION

Protein kinase C has been shown to be involved in heterologous desensitization in several tissues, including the rat hepatocyte. Activation of protein kinase C by

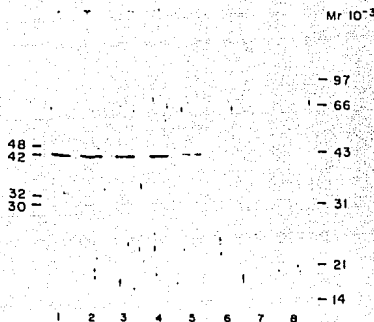
HETEROLOGOUS DESENSITIZATION AND G_i ACTIVITY


FIG. 1. Immunoblot of membranes from control or PMA-treated hepatocytes stained with anti- G_i antiserum. Membranes from control (lanes 2, 4, 6, and 8) or PMA-treated hepatocytes (lanes 1, 3, 5, and 7) were loaded into a gel for SDS-PAGE and subjected to immunoblotting. Amounts of protein: lanes 1 and 2, 200 μ g; lanes 3 and 4, 100 μ g; lanes 5 and 6, 50 μ g; lanes 7 and 8, 25 μ g. Immunoblot is representative of 4 experiments with identical results.

phorbol esters promotes heterologous desensitization of the hepatic adenylate cyclase (8, 10, 15, 17, 23, 30). In mouse Leydig cells, phorbol esters reduced by 40% the stimulation of adenylate cyclase by hormones or Gpp(NH)p but slightly increased forskolin-stimulated activity (28). Similar observations have been made in GH₃ pituitary cells (40) and human mononuclear leukocytes (27). Thus protein kinase C appears to modulate the hormone-sensitive adenylate cyclase. Although explored to some extent for G protein-linked receptors, the role of protein kinase C in heterologous desensitization at the level of G proteins has not been described.

In the present work we focused on analyzing the status of G_i in rat hepatocytes challenged with PMA, an activator of protein kinase C. Adenylate cyclase activity in response to either Gpp(NH)p or NaF was attenuated in membranes from hepatocytes treated with PMA. The possibility that the effects of PMA were being expressed on the catalyst of adenylate cyclase was evaluated using forskolin. Forskolin-stimulated adenylate cyclase activity was unaltered by PMA treatment, while the response to guanine nucleotide and fluoride ion was impaired. Thus the PMA-induced desensitization was not attributable to a reduction in catalyst activity. Hepatocytes, like most mammalian cells, display both stimulatory and inhibitory adenylate cyclase regulation. The inhibitory regulation, mediated by G_i , does not appear to play an important role in the desensitization examined in our study (but see Ref. 34). The conditions of both the membrane isolation process and the assay do not support G_i -mediated inhibition of adenylate cyclase (19, 32). In addition, G_i -mediated responses have been shown to be inhibited by activation of protein kinase C (29, 33). Furthermore, it has been recently shown that this loss

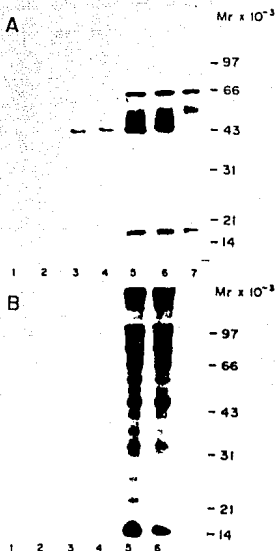


FIG. 5. Immunoprecipitation of G_i . A: membranes from control (lanes 1, 3, 5, 7) or PMA-treated hepatocytes (lanes 2, 4, 6) were subjected to ADP-ribosylation in the absence (lane 7) or presence (lanes 1, 6) of cholera toxin. Membranes were directly loaded into the gel (lanes 5, 7) for SDS-PAGE or solubilized and subjected to the immunoprecipitation protocol using anti- G_i (lanes 1 and 2) or nonimmune (lanes 3 and 4) sera. B: hepatocytes were incubated with 1 μ M PIP (1 and 6) in the absence (lanes 1, 3, 5) or presence of PMA (lanes 2, 4, 6), membranes isolated and loaded directly into the gel for SDS-PAGE (lanes 5 and 6) or subjected to the immunoprecipitation protocol using anti- G_i (lanes 3 and 4) or nonimmune (lanes 1 and 2) sera.

of G_i inhibitory function is associated with $G_{i\alpha}$ phosphorylation (33). It should be mentioned, however, that pertussis toxin blocks the PMA-induced heterologous desensitization in hepatocytes (15, 16, 29). The mechanism(s) through which pertussis toxin exerts this effect is unknown but seems to be unrelated to its action on G_i (15, 16, 29).

Cholera toxin catalyzes the ADP-ribosylation of $G_{i\alpha}$ and activates this G protein subunit. Cholera toxin treatment of hepatocytes elevated cAMP accumulation. In PMA-treated cells, cholera toxin-stimulated cAMP levels were reduced. This observation is in agreement with the adenylate cyclase response of membranes from PMA-treated cells to stimulation by Gpp(NH)p and NaF and suggested a role for $G_{i\alpha}$ modulation in PMA action.

Further insight into the effects of PMA on $G_{i\alpha}$ resulted

from the reconstitution analysis of its functional status. Detergent extracts of control and PMA-treated cell membranes reconstituted agonist-stimulated adenylate cyclase of S49 *cys*⁻ mutant cell membranes that are deficient of G_α. The levels of G_α activity in extracts of membranes from PMA-treated cells were, however, lower than those for control membrane extracts. These data provide compelling evidence to suggest that PMA alters the functional status of G_α in hepatocytes.

The structural status of G_α subunits from control and PMA-treated hepatocytes was evaluated by [³²P]NAD⁺-dependent cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation. G_α species of M_r 42,000 and 46,000/48,000 were specifically radiolabeled in membranes from untreated and PMA-treated hepatocytes alike. Although not affecting the apparent M_r of G_α species, treatment of hepatocytes with PMA reduced the amount of radiolabel incorporated into these toxin substrates. We previously studied the level of G_α in hepatocytes from animals with different conditions (9) and arrived at the conclusion that G_α is not rate limiting, at least for the β-adrenergic responsiveness of hepatocytes. Therefore, a large decrease in G_α would have been expected if a change in the amount of this protein was responsible for the desensitization. However, no such change in the amount of G_α was detected in the immunoblots. The possibility that phosphorylation of G_α could be the molecular basis of the desensitization was addressed, but the results did not support it. Therefore, the mechanism(s) underlying the alteration in the functional status of G_α and its radiolabeling by cholera toxin remains to be established. To the best of our knowledge, G_α phosphorylation *in vivo* has not been reported, and no "positive" control can be provided. However, problems such as dephosphorylation during immunoprecipitation or loss of antibody recognition for phosphorylated G_α does not seem likely as phosphorylation of G_α-2 can be demonstrated by this same approach (33).

Another limitation as to the generalization of the findings is the fact that we use in our study hypothyroid animals. Differences may exist in the desensitization mechanisms between cells from hypothyroid and euthyroid animals. However, it should be mentioned that in hepatocytes from euthyroid rats, PMA also induces desensitization of adenylate cyclase (17, 29, 30).

In summary, the present data clearly demonstrate through several independent strategies that activation of protein kinase C by PMA results in heterologous desensitization of adenylate cyclase through a change in the functional status of G_α. Thus, in addition to receptors, G proteins may be a site for expression of heterologous desensitization.¹

We thank Guadalupe Ramirez for skillfully typing the manuscript. The generous gift by Dr. Lotz Bärnhammer of some of the S49 cell membranes used in this study is gratefully acknowledged. We express our gratitude to Dr. Allen Spiegel for his generosity in providing the anti-G_α antiserum and for advice in the immunoprecipitation studies; his kind revision of the manuscript is also greatly appreciated.

This research was partially supported by CONACYT Grant 145/88.

¹A recent paper has shown PMA-induced phosphorylation of G_α and no phosphorylation of G_β (4), an observation in support of our findings.

P228CCOX891590, DGAPA Grant IN-021889, and National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grants DK-30111 and DK-25410.

Address for reprint requests: J. A. García-Sáinz, IFC-UNAM, Ap. Postal 70-248, Mexico DF 04510, Mexico.

Received 2 April 1990; accepted in final form 28 August 1990.

REFERENCES

1. BENOVIĆ, J. L., R. H. STRASSER, M. G. CARON, and R. J. LEE. β -Adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2797-2801, 1986.
2. BERRY, M. N., and D. S. FRIEND. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43: 506-520, 1980.
3. BROWN, B. L., J. D. M. ALBANO, P. EKINS, and A. M. SIGHELE. A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Biochem. J.* 121: 561-562, 1971.
4. BUSHFIELD, M. G., J. MURPHY, B. E. LAVAN, P. J. PARKER, V. J. HIRSH, G. MILLHAUS, and M. D. HOUSLAY. Hormonal regulation of G_α subunit phosphorylation in intact hepatocytes. *Biochem. J.* 268: 419-427, 1990.
5. CASTAGNA, M., Y. TAKAI, K. KADICICH, K. SANO, U. KIKKAWA, and Y. NISHIZUKA. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851, 1982.
6. CLARK, R. B., M. W. KUNKEL, J. FRIEDMAN, T. J. GOKA, and J. A. JOHNSON. Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylate cyclase in S49 wild-type lymphoma cells (β -adrenergic receptor). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1142-1146, 1988.
7. CORVEA, S., S. M. T. HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, and J. A. GARCÍA-SÁINZ. Modulation by thyroid status of cAMP-dependent and Ca²⁺-dependent mechanisms of hormone action in rat liver cells. Possible involvement of two different transduction mechanisms in β -adrenergic action. *Biochim. Biophys. Acta* 803: 95-105, 1984.
8. GARCÍA-SÁINZ, J. A., S. M. T. HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, J. L. CONTRERAS-RODRÍGUEZ, and M. MACÍAS-SILVA. Effect of H₂O on the modulation of glucagon actions by activators of protein kinase C. *Biochem. Int.* 18: 213-219, 1989.
9. GARCÍA-SÁINZ, J. A., M. E. HUERTA-BAHENA, and C. C. MALDONADO. Hepatocyte β -adrenergic responsiveness and guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Am. J. Physiol.* 256 (Cell Physiol. 25): C384-C389, 1989.
10. GARCÍA-SÁINZ, J. A., F. MENDELÓVIC, and M. A. MARTÍNEZ-OLMEDO. Effect of phorbol esters on alpha₁-adrenergic mediated and glucagon-mediated actions in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 228: 277-280, 1985.
11. GARCÍA-SÁINZ, J. A., and B. MICHEL. Homologous beta-adrenergic desensitization in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 216: 331-336, 1987.
12. GILMAN, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649, 1987.
13. HARDEN, T. K. Agonist-induced desensitization of the beta-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacol. Rev.* 35: 5-32, 1983.
14. HARLOW, E., and D. LANE. *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor, 1988, p. 471-510.
15. HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S. M. T., M. MACÍAS-SILVA, M. PLEBANSKI, and J. A. GARCÍA-SÁINZ. Homologous and heterologous β -adrenergic desensitization in hepatocytes. Additivity and effect of pertussis toxin. *Biochim. Biophys. Acta* 972: 311-319, 1988.
16. HENWORTH, C. M., E. M. HANNA, and M. D. HOUSLAY. Islet-activating protein blocks glucagon desensitization in intact hepatocytes. *Biochem. J.* 222: 189-191, 1981.
17. HENWORTH, C. M., A. P. WHEATON, A. R. KINSSELLA, and M. D. HOUSLAY. The phorbol ester, TPA, inhibits glucagon-stimulated adenylate cyclase activity. *FEBS Lett.* 170: 38-42, 1984.
18. HOLLESBERG, M. D. Control of receptor function by homologous and heterologous ligands. In *Mechanisms of Receptor Regulation*, edited by G. Poste and S. T. Crooke. New York: Plenum, 1985, p. 285-322.
19. JARD, S., B. CANTAU, and K. H. JAKOBSSON. Angiotensin II and α -adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase. *J. Biol.*

HETEROLOGOUS DESENSITIZATION AND G_i ACTIVITY

- Chem* 256: 2603-2606, 1981.
20. KELLEHER, D. J., J. E. PESSIN, A. E. RUOHU, AND G. L. JOHNSON. Phorbol ester induces desensitization of adenylate cyclase and phosphorylation of the β -adrenergic receptor in turkey erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4316-4320, 1984.
 21. JAYES, E. G., AND J. C. BEUSHAW-LOREN. Preparation of rat liver plasma membranes in a high yield. *Anal. Biochem.* 153: 183-185, 1986.
 22. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, AND R. J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
 23. LYNCH, C. J., R. CHAREST, S. B. RUCKENSTEIN, J. H. ENTON, AND P. F. BLACKMOR. Inhibition of hepatic α_1 adrenergic effects and binding by phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* 260: 2844-2851, 1985.
 24. MALBON, C. C. Liver cell adenylate cyclase and β -adrenergic receptors: Increased β -adrenergic receptor number and responsiveness in the hypothyroid rat. *J. Biol. Chem.* 255: 8692-8699, 1980.
 25. MALBON, C. C., M. P. GRAZIANO, AND G. L. JOHNSON. Fat cell β -adrenergic receptor in the hypothyroid rat. Impaired interaction with the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 3254-3260, 1984.
 26. MALBON, C. C., S.-Y. LI, AND J. N. FAIS. Hormonal activation of glycogen phosphorylase in hepatocytes from hypothyroid rats. *J. Biol. Chem.* 253: 8820-8825, 1978.
 27. MELIUS, H., H. E. KAUFMAN, A. TIMMERMAN, F. T. M. VAN AMSTERDA, G. H. KOEDER, AND K. DE VRIES. Phorbol 12-myristate 13-acetate induces beta adrenergic receptor uncoupling and non-specific desensitization of adenylate cyclase in human mononuclear leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 35: 1217-1222, 1986.
 28. MUKHOPADHYAY, A. K., AND M. SCHMACHER. Inhibition of hCG-stimulated adenylate cyclase in purified mouse Leydig cells by the phorbol ester PMA. *FEBS Lett.* 187: 56-60, 1985.
 29. MURPHY, G. J., D. J. GAWLER, G. MILDEN, M. J. O. WAKEFAM, N. J. PYNE, AND M. D. HOUSLAY. Glucagon desensitization of adenylate cyclase and stimulation of inositol phospholipid metabolism does not involve the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G_i, which is inactivated upon challenge of hepatocytes with glucagon. *Biochem. J.* 259: 191-197, 1989.
 30. MURPHY, G. J., V. J. HUBBY, D. TRIVETT, M. J. O. WAKEFAM, AND M. D. HOUSLAY. The rapid desensitization of glucagon-stimulated adenylate cyclase is a cAMP-independent process that can be mimicked by hormones which stimulate inositol phospholipid metabolism. *Biochem. J.* 243: 39-46, 1987.
 31. NAMBI, P., J. R. PETERS, D. R. SHIBLEY, AND R. J. LEFKOWITZ. Desensitization of turkey erythrocyte β -adrenergic receptor in a cell free system. Evidence that multiple protein kinases can phosphorylate and desensitize the receptor. *J. Biol. Chem.* 260: 2163-2171, 1985.
 32. PORNSE, B. F., E. L. HEWLETT, AND J. C. GARIBSON. Role of Ni²⁺ in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenylate cyclase in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260: 16290-16293, 1985.
 33. PYSSE, N. J., G. J. MURPHY, G. MILDEN, AND M. D. HOUSLAY. Treatment of intact hepatocytes with either the phorbol ester TPA or glucagon elicits the phosphorylation and functional inactivation of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G_i. *FEBS Lett.* 243: 77-82, 1989.
 34. RICE, K. A., J. COBINA, G. FLOYD, R. SERRA, J. D. HILDEBRAND, AND R. IVESGAR. Glucagon-induced heterologous desensitization of the MDCK cell adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 7893-7901, 1984.
 35. SALOMON, Y., C. LUNDIN, AND M. ROBBEL. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58: 541-548, 1974.
 36. SHIBLEY, D. R., P. NAMBI, J. R. PETERS, AND R. J. LEFKOWITZ. Phorbol diesters promote β -adrenergic receptor phosphorylation and adenylate cyclase desensitization in duck erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 973-979, 1984.
 37. SIMONIS, W. F., G. R. GOLDSMITH, J. COHINA, C. G. USONIS, AND A. M. SHIBALE. G_{i2} mediates α -adrenergic inhibition of adenylate cyclase in platelet membranes: in situ identification with G_i C-terminal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7809-7813, 1989.
 38. SIMONIS, W. F., P. R. GOLDSMITH, C. J. WOODARD, C. G. USONIS, AND A. M. SHIBALE. Receptor and effector interactions of G_i. Functional studies with antibodies to the as carboxyl-terminal decapeptide. *FEBS Lett.* 239: 189-194, 1989.
 39. STURLOVE, B. J., M. SAMDEL, AND R. J. LEFKOWITZ. Adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptors. In: *Mechanisms of Receptor Regulation*, edited by G. Poste and S. T. Crooke. New York: Plenum, 1985, p. 279-294.
 40. SUMMERS, S. T., AND J. J. CHOMIS. Phorbol esters induce two distinct changes in G_{i1} primary cell adenylate cyclase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 262: 12-18, 1988.
 41. YOSHIMIZU, T., D. R. SHIBLEY, M. BOIVIER, R. J. LEFKOWITZ, AND M. G. CARON. Cross-talk between cellular signalling pathways suggested by phorbol ester-induced. *Nature Lond.* 327: 67-69, 1987.

En resumen los resultados obtenidos muestran lo siguiente:

La activación de la adenilato ciclasa (incremento de AMPc), el aumento de la concentración de calcio citosólico y la estimulación del metabolismo hepático (ureogénesis, glucogenólisis y síntesis de citrulina) son algunas de las acciones que el glucagon ejerce en el hígado. Estas acciones que tiene la hormona son disminuidas por activadores de la proteína cinasa C, tales como vasopresina y los ésteres de forbol. (Trabajos 1 y 2).

El H-7 un potente inhibidor de la proteína cinasa C disminuye marcadamente los efectos que los activadores de la PKC, vasopresina y PMA tienen sobre las acciones de glucagon, estableciendo claramente la participación de la PKC en la regulación de la transducción (Trabajo 1).

Los activadores de la proteína cinasa C tienen un mismo efecto sobre algunas de las acciones que ejerce el glucagon en el metabolismo hepático de ratas hipotiroideas y en el de las ratas normales, como son la estimulación de la acumulación de AMPc y de la producción de glucosa. Sin embargo se observó que la estimulación por el glucagon del incremento en la $[Ca^{++}]$ citosólica y del metabolismo mitocondrial (evaluado tomando como parámetros la síntesis de urea y de citrulina), son disminuidos por los ésteres de forbol en una mayor proporción en las ratas hipotiroideas con respecto a las normales (Trabajo 2).

Los resultados obtenidos sugieren que la activación fisiológica de la proteína cinasa C por vasopresina o su activación farmacológica por el forbol miristato acetato altera las acciones del glucagon por lo menos a dos niveles: (i) la producción de AMPc y (ii) la elevación de la concentración de calcio citosólico. Además se observa que las células de las ratas hipotiroideas son más sensibles a las acciones de los ésteres de forbol.

Con respecto a la modulación del sistema de transducción de la adenilato ciclasa, la activación de la proteína cinasa C induce una alteración en la activación de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Los resultados obtenidos parecen indicar que se induce una alteración en el estado funcional de la proteína Gs sin observarse cambios en la cantidad de este componente. Además dicha alteración no parece ser causada por una fosforilación de Gs (Trabajo 3).

En cuanto a la alteración que induce la proteína cinasa C sobre la acumulación de calcio citosólico, aún no hemos explorado el mecanismo a través del cual se produce este efecto.

DISCUSION

El papel de la proteína cinasa C en la regulación de la transducción de las señales hormonales ha sido ampliamente documentado; su activación puede ocasionar en algunos sistemas una inhibición de la respuesta celular mientras que en otros provoca una estimulación.

En el presente trabajo, nuestro interés principal consistió en estudiar los efectos de la activación de la PKC sobre las acciones del glucagon en hepatocitos de rata.

Inicialmente estudiamos el efecto de la proteína cinasa C, activada por vasopresina o por PMA, sobre el metabolismo hepático estimulado por glucagon en ratas hipotiroideas. Elegimos este modelo biológico porque se ha reportado que en estas células las hormonas movilizadoras de calcio como vasopresina y angiotensina estimulan pobremente el metabolismo hepático aún cuando el sistema de transducción al que están acopladas funciona bien. De esta manera los hepatocitos de ratas hipotiroideas son ideales para activar fisiológicamente a la PKC con hormonas, sin activar vías metabólicas como la ureogénesis o la glucogenólisis (45).

En este trabajo se observó que el glucagon estimula la acumulación de AMPc y la ureogénesis de una manera dependiente de la dosis. Cuando los hepatocitos son incubados con vasopresina o PMA para activar a la PKC y después son

estimulados con glucagon observamos una notable disminución sobre la ureogénesis y la acumulación de AMPc, sin notar cambios en la EC50 para glucagon. Estos datos muestran que la activación de la PKC lleva a una inhibición de la activación de la adenilato ciclasa, en este sistema.

El uso del H-7 un derivado de isoquinolinas que resulta ser un potente inhibidor de la PKC al competir con el ATP, bloquea las acciones que la vasopresina y el PMA ejercen sobre los hepatocitos estimulados con glucagon, apoyando claramente la participación de la PKC en la regulación del sistema de la adenilato ciclasa.

Nuestro grupo había reportado que la acumulación de AMPc estimulada por glucagon era disminuida por PMA en hepatocitos de ratas normales. En esas mismas células observaron que la ureogénesis estimulada por glucagon no se afectaba por el PMA, mientras que la estimulada por epinefrina (α 1-adrenérgica) era totalmente bloqueada (46).

Cuando se realizaron experimentos similares pero en hepatocitos obtenidos de ratas hipotiroideas, se observó una inhibición de la acumulación de AMPc estimulada por glucagon similar a la observada en las ratas normales, pero lo sorprendente fue observar que la síntesis de urea estimulada por glucagon estaba notablemente disminuida en las células de ratas hipotiroideas en comparación a las normales.

La acción de uno de los análogos del glucagon, el THG, que es capaz de estimular la ureogénesis sin inducir un aumento en

la producción de AMPc (47), también fue notablemente disminuida por los ésteres de forbol en células de ratas hipotiroideas en comparación con las normales.

Esta serie de datos sugerían que el metabolismo de los hepatocitos de ratas hipotiroideas presentaba claramente una mayor sensibilidad a las acciones de los ésteres de forbol.

Decidimos explorar este punto, estudiando las acciones del PMA sobre la estimulación del metabolismo hepático inducida por glucagon estableciendo una comparación entre los hepatocitos de ratas hipotiroideas y los de ratas normales (eutiroideas).

Si se estimula al metabolismo hepático evitando la activación de la adenilato ciclasa, con el uso de un análogo del AMPc como el dibutiril AMP cíclico (dbAMPc), se observa que las acciones de este segundo mensajero son también inhibidas por el PMA. En este caso también se vió que el PMA tiene efectos más marcados en el estado hipotiroideo.

Los resultados señalan que el PMA está ejerciendo sus efectos tanto a nivel del sistema de transducción de la adenilato ciclasa como a nivel de las acciones que el segundo mensajero AMPc tiene sobre el metabolismo celular.

En un principio decidimos investigar si esta mayor sensibilidad a los ésteres de forbol encontrada en el estado hipotiroideo, podría deberse a una sensibilidad generalizada de las células debida al estado tiroideo de los animales o bien si era una particularidad de la vía metabólica (ureogénesis). Lo primero no parecía ser la causa en este

caso, ya que el PMA induce la misma inhibición de la adenilato ciclasa en células de ratas normales y de hipotiroideas; además la respuesta α -adrenérgica es inhibida notablemente por el PMA independientemente del estado tiroideo del animal.

Todo lo anterior sugería que la mayor sensibilidad encontrada en las células de ratas hipotiroideas parecía ser una característica de la vía metabólica (síntesis de urea); por lo tanto decidimos estudiar los efectos del PMA sobre la glucogenólisis estimulada por glucagon y dbAMPc, ya que la glucogenólisis es una vía exclusivamente citosólica, a diferencia de la ureogénesis que es bicompartamentalizada con enzimas citosólicas y mitocondriales. Encontramos que la producción de glucosa estimulada por glucagon es inhibida solo parcialmente por el PMA sin importar el estado tiroideo de los animales.

Estos resultados indicaban que los ésteres de forbol ejercen un efecto mayor sobre el metabolismo mitocondrial y que este se acentúa en el estado hipotiroideo. Esto fue apoyado con los datos obtenidos al cuantificar la síntesis de citrulina estimulada por glucagon, dbAMPc o THG, y observar una mayor inhibición de esta por PMA en el estado hipotiroideo.

De esta serie de datos podemos concluir, que el PMA ejerce al menos dos efectos sobre las acciones de glucagon: uno a nivel del sistema de transducción ya que inhibe la generación del mensajero AMPc, y otro sobre el metabolismo, ya que

también inhibe las acciones del AMPc mimetizadas por el dbAMPc. También es claro que en las células de ratas hipotiroideas existen factores que las hacen más susceptibles a las acciones de los ésteres de forbol.

Se ha sugerido que en los hepatocitos de ratas hipotiroideas, los mecanismos implicados en la movilización de calcio están alterados (45,48), sin embargo este fenómeno no ha sido totalmente aclarado.

Corvera y colaboradores, mostraron que las respuestas metabólicas a vasopresina y angiotensina están marcadamente disminuidas en el estado hipotiroideo; además la respuesta glucogenolítica al ionóforo de calcio A-23187 está también disminuida, sugiriendo que los hepatocitos de ratas hipotiroideas son menos sensibles a las señales de calcio (45). Otros grupos también han observado que en el estado hipotiroideo los mecanismos que participan en el control de la homeostasis de calcio están alterados (48,100).

Dado que el calcio intracelular juega un papel muy importante en la regulación del metabolismo mitocondrial decidimos estudiar los efectos del PMA sobre el incremento de la concentración de calcio citosólica estimulada por glucagon, THG y dbAMPc, y observamos que mientras que en las ratas normales estos efectos son disminuidos parcialmente, en las células de ratas hipotiroideas sorprendentemente dichas acciones están totalmente bloqueadas.

En resumen, nuestros resultados muestran que la acumulación de AMPc estimulada por glucagon y la glucogenólisis estimulada por glucagon o dibutiril AMPc (dbAMPc) están disminuidas por PMA de manera similar en hepatocitos de ratas normales e hipotiroideas. En cambio, la síntesis de urea, la síntesis de citrulina y el incremento en la concentración de calcio citosólica, estimulados por glucagon, dbAMPc o THG, están notablemente disminuidos en las ratas hipotiroideas en comparación con las normales.

De lo anterior, podemos concluir que el PMA afecta marcadamente las acciones del glucagon sobre el metabolismo mitocondrial y sobre los mecanismos movilizadores de calcio en el estado hipotiroideo y solo parcialmente en el estado eutiroideo.

Se desconoce como el glucagon regula el metabolismo mitocondrial, pero se ha sugerido una participación del calcio. (91). La ureogénesis y la síntesis de citrulina estimuladas por glucagon parecen estar más relacionadas con cambios en la concentración de calcio citosólica que con el aumento del AMPc. Además se ha observado que la activación de la glutaminasa y de la síntesis de citrulina por glucagon, están disminuidas en hepatocitos depletados de calcio (49, 50). Esto está también apoyado por los estudios de Johnston y Brand quienes reportan que concentraciones submicromolares de calcio extramitocondrial estimulan la síntesis de citrulina en mitocondrias de hígado. (51).

Staddon y Hansford (52, 53) han observado también un mayor efecto del PMA sobre el metabolismo mitocondrial que sobre el citosólico, ya que encuentran que el glucagon es capaz de incrementar la concentración de la piruvato deshidrogenasa activa (enzima mitocondrial) y de la piruvato cinasa inactiva (enzima citosólica), y que el PMA bloquea la estimulación de la piruvato DH, sin afectar a la piruvato cinasa, lo cual apoya nuestras conclusiones.

Desconocemos las causas por las cuales los mecanismos implicados en la movilización de calcio son más sensibles en el estado hipotiroideo en comparación con el normal. Sin embargo las causas parecen ser el resultado de un proceso ya alterado en el estado hipotiroideo, que es la regulación de la homeostasis de calcio.

Hasta este momento podemos concluir, que la proteína cinasa C regula la transducción de la señal del glucagon, ejerciendo al menos dos efectos:

- 1) Inhibiendo la generación de AMPc, al regular al sistema de la adenilato ciclasa, y
- 2) Bloqueando la movilización de calcio estimulada por glucagon.

La última parte de este trabajo corresponde al estudio de la regulación del sistema de la adenilato ciclasa por la proteína cinasa C (PKC). Se ha observado que la PKC activada por los ésteres de forbol tiene diferentes efectos sobre la adenilato ciclasa dependiendo del tipo celular. En eritrocitos de pavo y de pato el PMA induce la fosforilación de los receptores β -adrenérgicos y en consecuencia una desensibilización de la adenilato ciclasa (54,55). En cambio en los eritrocitos de rana, el PMA induce una fosforilación de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, lo cual lleva a un aumento en la actividad de la enzima (56).

En nuestro sistema, hepatocitos aislados de rata, el PMA y las hormonas que activan a la PKC, provocan una disminución en los niveles de AMP cíclico estimulados por glucagon o por agonistas β -adrenérgicos (46,59-62) y en consecuencia inducen una desensibilización del sistema del tipo heterólogo.

En este trabajo, nosotros exploramos cual de los componentes del sistema de transducción de la adenilato ciclasa es afectado por la acción del PMA. Por lo tanto decidimos estimular al sistema a través de cada uno de sus componentes en condiciones controles y bajo la acción del PMA, y evaluamos como este agente influía sobre la actividad de la adenilato ciclasa.

Inicialmente observamos que la activación del sistema de la adenilato ciclasa a nivel de Gs, utilizando agentes como el

Gpp(NH)p y el fluoruro de sodio, era disminuida por el PMA, mientras que la activación directa de la subunidad catalítica con forskolina, no era afectada bajo este tratamiento.

Por otro lado la activación de Gs inducida por la ADP-ribosilación con toxina del cólera, lleva a una activación permanente de la adenilato ciclasa (63). Esta acción vista como la acumulación de AMP cíclico estimulada por toxina del cólera en células intactas es disminuida con el tratamiento con PMA. Además el pretratamiento de los hepatocitos con toxina del cólera induce un aumento en la actividad basal y en la estimulada por GTP, de la adenilato ciclasa en membranas. Estos efectos también son inhibidos por el PMA, sin afectar la acción de la forskolina.

Este conjunto de resultados señalan que el blanco de las acciones del PMA no es la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa y por lo tanto sugieren que el PMA podría estar modulando a la proteína reguladora Gs. Con base en esto nos avocamos a estudiar el estado estructural y funcional de Gs bajo el tratamiento con PMA, utilizando diferentes enfoques.

El estado funcional de Gs fué evaluado realizando experimentos de reconstitución, utilizando extractos de colato de membranas de hepatocitos control y tratados con PMA. Los datos muestran que el PMA disminuye la habilidad de los extractos para reconstituir la actividad de la adenilato ciclasa en las membranas de células de linfoma de ratón S49 cyc-. Este modelo celular posee los componentes del sistema de la adenilato ciclasa excepto la proteína acopladora Gs.

Otro enfoque que daría información sobre el estado funcional de Gs, hubiera sido la cuantificación de la actividad de GTPasa de Gs; desafortunadamente no logramos encontrar las condiciones que nos permitieran evaluar este parámetro.

El estado estructural de Gs se exploró analizando la ADP-ribosilación de Gsa por la toxina del cólera. Nuestros datos muestran que en los hepatocitos de rata la toxina del cólera cataliza la ADP-ribosilación de 3 péptidos: uno de 42 kDa y un doblete de 46-48 kDa, y que el PMA disminuye la ADP-ribosilación de todas estas formas de Gsa.

Estos datos sugerían que el efecto del PMA sobre G_s podría provocar una modificación de Gs de tal suerte que ahora resultara un mal sustrato para la toxina del cólera o bien que podría estar ocasionando una disminución en la cantidad de Gs disponible.

Esta última posibilidad fué explorada tratando de evaluar la cantidad de Gs_α a través de un inmunoblot. Sin embargo los datos muestran que la cantidad de Gs_α inmunoreactiva no es alterada bajo el tratamiento con PMA, lo cual prueba que una disminución en la cantidad de Gs no es la causa de la desensibilización de la adenilato ciclasa.

García-Sáinz y colaboradores (64), previamente habían evaluado los niveles de Gs en hepatocitos de animales con diferentes estados fisiológicos (ratas normales,

hipotiroideas, adrenalectomizadas y parcialmente hepatectomizadas), y concluyeron que la cantidad de Gs no es limitante para observar una respuesta β -adrenérgica, de tal manera que debería ocurrir una disminución notable de esta proteína para poder causar una desensibilización; incluso Chang y Bourne (65) encontraron que una exposición prolongada a toxina del cólera causa degradación de Gs_{α} hasta en un 90% sin modificarse la activación de la adenilato ciclasa, sugiriendo que Gs esta en exceso y apoyando así nuestros resultados.

Por lo tanto supusimos entonces que el PMA podría estar induciendo una modificación sobre Gs. Recientemente se ha descrito que la PKC puede regular la acción de las proteínas G. Se ha observado que la acción de G_i es inhibida por la PKC (66-69) y esto parece estar asociado a una fosforilación de G_i_{α} (67). La posibilidad de una fosforilación de Gs como la causa de la desensibilización fue explorada.

Inicialmente logramos inmunoprecipitar a la proteína Gs_{α} ADP-ribosilada dándole así validez a nuestro protocolo de inmunoprecipitación; sin embargo no fué posible inmunoprecipitar a la proteína Gs_{α} fosforilada, y bajo ninguna de las condiciones empleadas se detectó a la proteína fosforilada. No obstante, recientemente nuestros datos fueron corroborados por los estudios de Houslay y colaboradores (70) quienes utilizando hepatocitos de rata tratados con PMA detectaron a la proteína G_i_{α} fosforilada, pero no a Gs_{α} , apoyando así nuestros resultados.

El hecho de que la proteína Gi fosforilada pueda ser inmunoprecipitada, disminuye las posibilidades de que Gs al ser fosforilada no pudiera ser detectada con el anticuerpo (67). Además es importante señalar que esta última parte del trabajo se realizó con ratas hipotiroideas y que aunque el PMA también induce una desensibilización de la adenilato ciclasa en las ratas eutiroideas (60,62,66), pueden existir diferencias en la desensibilización entre las células de rata normales e hipotiroideas.

En este estudio, la proteína Gi que forma parte del brazo inhibitorio del sistema de la adenilato ciclasa, no parece jugar un papel importante en la regulación del sistema; además se ha observado que la activación de la PKC lleva a una inhibición de Gi, apoyando así la idea de que Gi no está ejerciendo sus acciones (95-98). Sin embargo, es importante señalar que se ha observado que la toxina pertussis bloquea las acciones inhibitorias que la PKC ejerce sobre el sistema de la adenilato ciclasa, y aunque el mecanismo de este fenómeno se desconoce no parece estar relacionado con la acción de la toxina sobre Gi (59,97,99).

Finalmente, podemos concluir que el PMA produce una alteración en el estado funcional de Gs, pero el mecanismo por el cual ocurre no ha sido aclarado aún.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo nos permiten concluir que la activación de la PKC por hormonas o ésteres de forbol regula la transducción de señales hormonales a través del sistema de la adenilato ciclasa.

En los hepatocitos aislados de rata la PKC provoca una inhibición de las acciones del glucagón sobre el metabolismo hepático por lo menos a dos niveles:

- i) A nivel de la transducción de la señal hormonal, inhibiendo la generación del segundo mensajero AMP cíclico, al inducir una alteración en el estado funcional de la proteína acopladora Gs, y
- ii) A nivel de las acciones del AMP cíclico sobre el metabolismo hepático.

Además observamos que el metabolismo de los hepatocitos de ratas hipotiroideas es más susceptible a las acciones de los ésteres de forbol que el de las ratas eutiroideas, probablemente por que los ésteres de forbol estén ejerciendo un efecto a nivel de los mecanismos movilizadores de calcio que en las células de las ratas hipotiroideas parecen estar alterados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ariens, E. J. (1983). Pharm. Weekb. Scien. Ed. 5:121-127.
- 2.- Birnbaumer, L., J. Abramowitz and A. M. Brown. (1990). Biochim. Biophys. Acta. 1031:163-224.
- 3.- Sibley, D.R., J.L. Benovic, M.G. Caron and R.J. Lefkowitz. (1987). Cell. 48:913-922.
- 4.- Rodbell, M. (1980). Nature. 284:17-22.
- 5.- García-Sáinz, J.A. (1987). en Mensaje Bioquímico. vol. X. 177-210 pp.
- 6.- Katada, T., Bokoch, G.M., Northup, J.K., Ui, M., and Gilman, A.G. (1984). J. Biol. Chem. 259:3568-3567.
- 7.- Jelsema, C.L. and Axelrod, J. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:3623-3627.
- 8.- Cassel, D. and T. Pfeuffer. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:2669-2673.
- 9.- García-Sáinz, J.A. (1985). Ciencia. 36:97-103.
- 10.- Holmgren, J. (1981). Nature. 292:413-417.
- 11.- Kahn, R.A. and A.G. Gilman. (1984). J. Biol. Chem. 259:6235-6240.
- 12.- Pfeuffer, E., R.M. Drehev, H. Metzger and T. Pfeuffer. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:3086-90.
- 13.- Smigel, M.D. (1986). J. Biol. Chem. 261:1976-82.
- 14.- Gilman, A.G. (1987). Ann. Rev. Biochem. 56:615-49.
- 15.- Granot, J., A.S. Mildvan, K. Hiyama, H. Kondo and E.T. Kaiser. (1980). J. Biol. Chem. 255:4569-73.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 16.- Boune, H.R., P. Coffino and G.M. Tomkins. (1975).
Science. 187:750-752.
- 17.- Ross, E.M., A.C. Howlett, K. M. Ferguson and A.G.
Gilman. (1978). J. Biol. Chem. 253:6406-6412.
- 18.- Coffino, P., H.R. Boune and G.M. Tomkins. (1975). J.
Cell. Physiol. 85:603-610.
- 19.- Bourne, H.R., P. Coffino and G.M. Tomkins. (1975). J.
Cell. Physiol. 85:611-620.
- 20.- Ross, E.M. and A.G. Gilman. (1977). J. Biol. Chem.
252:6966-6969.
- 21.- Downes, C.P. and C. H. Macphee. (1990). Eur. J. Biochem.
193:1-18.
- 22.- Cockcroft, S. and B.D. Gomperts. (1985). Nature.
314:534-536.
- 23.- Litosch, I., C. Wallis and J.N. Fain. (1985). J. Biol.
Chem. 260:5464-5471.
- 24.- Boyer, J.L., C.P. Downes and T.K. Harden. (1989). J.
Biol. Chem. 264:884-890.
- 25.- Bizarri, C., M.D. Girolamo, M.C. D'Orazio and D. Corda.
(1990). Proc. Natl. Acad. Sci. 87:4889-4893.
- 26.- Rhee, S.G., P.G. Shu, S.H. Ryu and S.Y. Lee. (1989)
Science. 244:546-550.
- 27.- Mitchell, R.H. (1975). Biochim. Biophys. Acta. 415:81-
147.
- 28.- Berridge, M.J. (1987). Annu. Rev. Biochem. 56:159-193.

- 29.- Dowes, C.P. and R.H. Michel. (1985). en "Molecular mechanisms of transmembrane signalling". (Cohen and Houslay eds.). Elsevier. Netherlands. 3-56 pp.
- 30.- Mc Cormack, J.G. and R.M. Denton. (1986). TIBS 11: 258-262.
- 31.- Dreher, M.L. and M.R. Hanley. (1988). TIPS. 9: 114-115.
- 32.- Suresh, K.J. and J.R. Williamson. (1986). J. Biol. Chem. 261:14658-14664.
- 33.- Nishizuka, Y. (1986). Science. 233:305
- 34.- Nishizuka, Y. (1988). Nature. 334:661-665.
- 35.- Murray, A.W. (1987). TIBS. 12:53-54.
- 36.- Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka. (1982). J. Biol. Chem. 257(13):7847-7851.
- 37.- Norman, A.W. and G. Litwack (eds.) (1987). Hormones. Academic Press, Inc. 806 pp.
- 38.- Wakelam, M.J.O., G.J. Murphy, V.J. Hruby and M.D. Houslay. (1986). Nature. 323:68-71.
- 39.- Corvera, S., J. Huerta-Bahena, J.T. Pelton, V.J. Hruby, D. Trivedi and J.A. García-Sáinz. (1984). Biochem. Biophys. Acta. 804:434-441.
- 40.- Staddon, J.M. and R.G. Hansford. (1989). Eur. J. Biochem. 179:47-52.
- 41.- Oishi, K., R.L. Raynor, P.A. Charp and J.F. Kuo. (1988). J. Biol. Chem. 263(14):6865.
- 42.- Hannun, Y.A. and R.M. Bell (1988). J. Biol. Chem. 263(11):5124.
- 43.- Loomis, C.R. and R.M. Bell. (1988). J. Biol. Chem. 263(4):1682.

- 44.- Birnbaumer, L., J. Codina, R. Mattera, R.A. Cerione, J.D. Hildebrandt, T. Sunyer, F.J. Rojas, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and R. Iyengar. (1985). "Molecular mechanism of transmembrane signalling". (Cohen and Houslay ed.) Elsevier. Netherlands. 3-56 pp.
- 45.- Corvera, S., S.M.T. Hernández-Sotomayor and J.A. García Sáinz. (1984). *Biochim. Biophys. Acta.* 803: 95-105.
- 46.- García-Sáinz, J.A., F. Mendlovic, and M.A. Martínez-Olmedo. (1985). *Biochem. J.* 228, 277-280.
- 47.- Corvera, S., J. Huerta-Bahena, J.T. Pelton, V.J. Hruby, D. Trivedi and J.A. García-Sáinz. (1984). *Biochim. Biophys. Acta.* 804:434-441.
- 48.- Storm H. and C. van Hardeveld. (1986). *Biochim. Biophys. Acta.* 885:206-215.
- 49.- Corvera, S. and J.A. García-Sáinz. (1983). *Biochem. J.* 210:957-960.
- 50.- Corvera, S. and J.A. García-Sáinz. (1982). *Life Sci.* 31(22):2493-2498.
- 51.- Johnston, J.D. and M.D. Brand. (1989). *Biochem. J.* 257:285-288.
- 52.- Staddon, J.M. and R.G. Hansford. (1986). *Biochem. J.* 238:737-743.
- 53.- Staddon, J.M. and R.G. Hansford. (1987). *Biochem. J.* 241: 729-735.
- 54.- Kelleher, D.J., J.E. Pessin, A.E. Ruoho and G.L. Johnson. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:4316-4320.

- 55.- Sibley, D.R., P. Nambi, J.R. Peters and R.J. Lefkowitz. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121:973-979.
- 56.- Yoshimasa, T., D.R. Sibley, M. Bouvier, R. J. Lefkowitz and M.G. Caron. (1987). *Nature.* 327:67-70.
- 57.- Hollenberg, M.D. and P. Cuatrecasas. (1979). en *Receptor: General Principles and Procedures.* R. O'Brien (ed). Plenum Press, New York. vol I. 193-214 pp.
- 58.- García-Sáinz, J.A. (1987). en *Mensaje Bioquímico.* vol. X. 177-210 pp.
- 59.- Hernández-Sotomayor, S.M.T., M. Macías-Silva, M. Plebański and J.A. García-Sáinz. (1988). *Biochim. Biophys. Acta.* 972:311-319.
- 60.- Heyworth, C.M., A.D. Whetton, A.R. Kinsella and M.D. Houslay. (1984). *FEBS. Lett.* 170:38-42.
- 61.- Lynch, C.J., R. Charest, S.B. Bocckino, J.H. Exton, and P.F. Blackmore. (1985). *J. Biol. Chem.* 260:2844-2851.
- 62.- Murphy, G.J., V.J. Hruby, D. Trivedi, M.J.O. Wakelam, and M.D. Houslay. (1987). *Biochem. J.* 243:39-46.
- 63.- Gilman, A.G. (1987). *Annu. Rev. Biochem.* 56:615-649.
- 64.- García-Sáinz, J.A., M.E. Huerta-Bahena and C.C. Malbon. (1989). *Am. J. Physiol.* 256 (Cell Physiol. 25):C384-C389.
- 65.- Chang, C. and R.R.F. Handbovene. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:5352-5357.
- 66.- Murphy, G.J., D.J. Gawler, G. Milligan, M.J.O. Wakelam, N.J. Pyne and M.D. Houslay. (1989). *Biochem. J.* 259:191-197.

- 67.- Pyne, N.J., G.J. Murphy, G. Milligan and M.D. Houslay. (1989). FEBS. Lett. 243:77-82.
- 68.- García-Sáinz, J.A. and G. Gutiérrez-Venegas. (1989). FEBS. Lett. 257(2):427-430.
- 69.- Gutiérrez-Venegas, G. and J.A. García-Sáinz. (1991). FEBS. Lett. En Prensa.
- 70.- Bushfield, M., G.J. Murphy, B.E. Lavan, P.J. Parker, V.J. Hruby, G. Milligan and M.D. Houslay. (1990). Biochem. J. 268:449-457.
- 71.- Neer, E.J. and D.E. Clapham. (1988). Nature. 333:129-134.
- 72.- Casey, P.J. and A.G. Gilman. (1988). J. Biol. Chem. 263(6): 2577-2580.
- 73.- Spigel, A.M. (1989). TEM. Nov./Dic. 72-76 pp.
- 74.- Logothetis, D.E., Y. Kurachi, J. Galper, E.J. Neer, and D.E. Clapham. (1987). Nature. 325: 321-326.
- 75.- Okabe, K., A. Yatani, T. Evans, Y.K. Ho, J. Codina, L. Birnbaumer and A.M. Brown. (1990) J. Biol. Chem. 265: 12854- 12858.
- 76.- Kasiro, Y., H. Itoh, T. Kozasa, R. Toyama, T. Tsukamoto, M. Matsubara, M. Nakafuku, T. Obara, T. Takagi and R. Hernández. (1988). Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. vol. LIII. 209-220 pp.
- 77.- Stryer, L. and H.R. Bourne. (1986). Annu. Rev. Cell. Biol. 2:391-419.
- 78.- Gaal, J.C. and C.K. Pearson. (1986). TIPS. 11: 171-175.
- 79.- Lefkowitz, R.J. and M.G. Caron. (1988). J. Biol. Chem. 263:4993-4996.

- 80.- Schofield, P.R. and A. Abbott. (1989). TIPS. 10:207-212.
- 81.- Charest, R., V. Prpic, J.H. Exton and P. Blackmore. (1985). Biochem. J. 227:79-90.
- 82.- Berridge, M.J. and R. J. Irvine. (1989). Nature. 341: 197-205.
- 83.- Majerus, P.W., T.M. Connolly, V.S. Bansal, R.C. Inhorn, T.S. Ross and D.L. Lips. (1988). J. Biol. Chem. 263:3051-3054.
- 84.- Guillemette, G., T. Balla, A.J. Baukal and K.J. Calt. (1988). J. Biol. Chem. 263: 4541-4548.
- 85.- Williamson, J.R. and J. R. Monck. (1989). Ann. Rev. Physiol. 51:107-124.
- 86.- Theibert, A.B., S. Supattapone, P.F. Worley, J.M. Baraban, J.L. Meek and S.H. Snyder. (1987). J. Biol. Chem. 148: 1283-1289.
- 87.- Farago, A. and Y. Nishizuka. (1990). FEBS. Lett. 268:350-354.
- 88.- Pilkis, S., M.R. El-Maghrabi and T.H. Claus. (1988). Ann. Rev. Biochem. 57:755-783.
- 89.- Iwanij, V. and A.C. Vincent. (1990). J. Biol. Chem. 265:21302-21308.
- 90.- Mine, T., I. Kojima and E. Ogata. (1988). Biochim. Biophys. Acta. 970: 166-171.
- 91.- Johnston, J.D. and M. D. Brand. Biochim. Biophys. Acta. 1033:85-90.
- 92.- Mallat, A., C. Pavoine, M. Dufour, S. Lotersztajn, D. Bataille and F. Pecker. (1987). Nature. 325:620-622.

- 93.- Hagopian, W.A., H.S. Tager, B. Gysin, D. Trivedi and V. J. Hruby. (1987). J. Biol. Chem. 262:15506-15513.
- 94.- Grady, T., M. Fickova, H.S. Tager, D. Trivedi and V.J. Hruby. (1987). J. Biol. Chem. 262:15514-15520.
- 95.- Jald, S., B. Cantau and K.H. Jakobs. (1981). J. Biol. Chem. 256:2603-2606.
- 96.- Pobiner, B.F., E.L. Hewlett and J.C. Garrison. (1985). J. Biol. Chem. 260: 16200-16209.
- 97.- Murphy, G.J., D.J. Gawler, G. Milligan, M.J.O. Wakelam, N.J. Pyne and M.D. Houslay. (1989). Biochem. J. 259:191-197.
- 98.- Pyne, W.J., G.J. Murphy, G. Milligan and M.D. Houslay. (1989). FEBS Lett. 243:77-82.
- 99.- Heyworth, C.M., E.M. Hanski and M.D. Houslay. (1984). Biochem. J. 222:189-194.
- 100.- Dho, S., T.A. Ansah and R.M. Case. (1989). Cell. Calcium. 10:551-560.