

03081
4
307



Universidad Nacional Autónoma de México

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

Relación entre Sistemas de Transducción y Fosforilación de Proteínas

T E S I S
Para optar por el Grado de:
Doctor en Investigación Biomédica Básica
(BIOQUÍMICA)

P r e s e n t a l a
M. en C. Marina Macías Silva

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

RESUMEN

La angiotensina II (AII) es una de las principales hormonas peptídicas que participa activamente en la modulación del metabolismo hepático. Esta hormona ejerce sus acciones a través de receptores localizados en la membrana plasmática acoplados a la inhibición de la adenilato ciclasa y a la estimulación del metabolismo de fosfoinosítidos. La existencia de una heterogeneidad de los receptores de AII se sugirió hace mucho tiempo, sin embargo, no había sido posible demostrarla, hasta muy recientemente, con el desarrollo de dos antagonistas no peptídicos, pero selectivos, para los receptores de AII: Losartan (DuP 753) y el PD123177. El empleo de estos agentes nos permitió demostrar por primera vez que, en el hígado de rata, las acciones de AII sobre el metabolismo de fosfoinosítidos están mediadas por los receptores sensibles a Losartan, actualmente denominados AT1.

El estudio de la regulación de las acciones de la AII y de otras hormonas que modulan el metabolismo de fosfoinosítidos, a través de la fosforilación de proteínas, ha mostrado que la activación de algunas de las principales cinasas de proteínas del hígado tienen un papel importante en la modulación de la acción de dichas hormonas. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre el papel que las fosfatasas de proteínas tienen sobre las acciones de estas hormonas. Nosotros observamos que dos potentes inhibidores de las proteínas fosfatasas 1 y 2A, el ácido okadaico y la microcistina, son capaces de inhibir significativamente el recambio de fosfoinosítidos inducido por AII, vasopresina o epinefrina. Si

bien, las bases moleculares de los efectos de estos agentes no han sido del todo elucidadas, nosotros logramos observar que otros agentes no relacionados (como los antagonistas de calmodulina W7 y clorpromazina y el antibiótico nistatina) que comparten la habilidad de alterar la estructura del citoesqueleto e inducir la formación de "ampollas" en la membrana plasmática, también inhiben el metabolismo de fosfoinosítidos mediado por hormonas. Esto sugiere la posibilidad de que una perturbación en la estructura del citoesqueleto pueda llevar a un desacoplamiento entre la fosfolipasa C y la proteína G, impidiendo una transmisión eficiente de las señales hormonales.

ABSTRACT

Angiotensin II is one of the major bioactive peptides with a main role in the regulation of hepatic functions. Angiotensin II interacts with specific receptors located in the plasma membrane and coupled to adenylate cyclase inhibition and phosphoinositide turnover. Evidence for receptor subtypes has been extensively suggested, however, the recent synthesis of nonpeptide antagonists, Losartan (DUP753) and PD123177, has made possible to identify two receptor subtypes: AT1 and AT2 receptors. The use of both antagonists allowed us to show for the first time that angiotensin II mediates its actions through receptors sensitive to Losartan (AT1) in rat hepatocytes.

In liver, studies on the role that protein phosphorylation plays on hormone-stimulated phosphoinositide turnover, have shown that protein kinase activation modulates greatly the actions of several hormones. However, few studies have been made about the role that protein phosphatases play on the actions of those hormones.

We observed that two potent protein phosphatase inhibitors, okadaic acid and microcystin, are capable of inhibiting phosphoinositide turnover stimulated by AII, vasopressin or epinephrine. Although, the molecular basis of such effects remain to be elucidated, we were able to observe that several unrelated agents (such as chlorpromazine, W7 and nystatin) which share the ability to disrupt cytoskeletal structure and induce blebbing, also inhibit hormone-stimulated phosphoinositide turnover, our data suggest the possibility that disruption of cytoskeletal structure

may lead to G-protein-phospholipase C uncoupling and preventing an efficient hormone signal transduction.

PRESENTACION

El presente trabajo de tesis se realizó, utilizando como modelo biológico los hepatocitos de rata, y se encuentra dividido en dos partes:

PARTE I.

Caracterización farmacológica de los receptores de angiotensina II presentes en los hepatocitos de rata.....pag. 6

PARTE II.

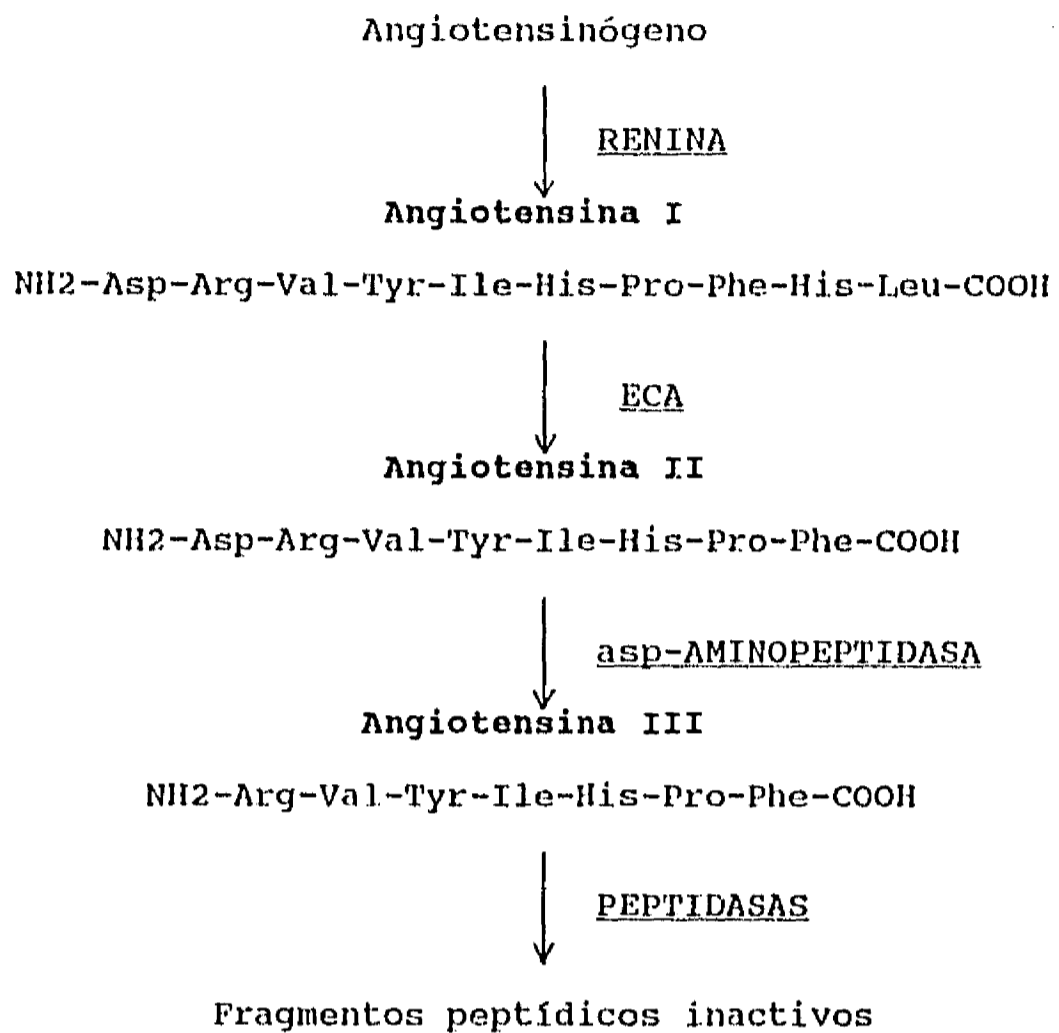
Estudio acerca del papel que la fosforilación de proteínas tiene sobre la regulación de las acciones de hormonas que modulan el metabolismo de fosfoinosítidos en el hígado de rata, tales como la angiotensina II, la vasopresina y la epinefrina. Estudiando particularmente el papel de las fosfatasas de proteínas....pag. 26

PARTE I.

ANGIOTENSINA II: RECEPTORES Y MECANISMO DE ACCION.

La angiotensina II (AII) es la principal hormona bioactiva del sistema renina-angiotensina (SRA), el cual participa de manera muy importante en el balance de agua y electrólitos, y en el control de la tensión arterial. Las acciones de esta hormona, sin embargo, no se limitan a participar en tan importante sistema, ya que se ha observado que además de regular la función renal, también tiene acciones sobre las funciones cardiovascular y endocrina, además de participar como neurotransmisor en el sistema nervioso (Valloton, 1987).

A la fecha se han caracterizado tres formas de angiotensinas, a las que por convención se les ha denominado tipo I, II y III. Estas hormonas son de naturaleza peptídica y se sintetizan a partir de una proteína plasmática, el angiotensinógeno, sobre la cual ejerce acciones hidrolíticas la renina, produciendo un decapeptido inactivo denominado Angiotensina I (AI). Cuando la AI es hidrolizada por la enzima convertidora de angiotensina se produce la forma activa de la angiotensina que corresponde al tipo II. La angiotensina II es sumamente sensible a proteólisis y cuando es hidrolizada por una aminopeptidasa específica (para aspártico), se origina la angiotensina III, que es un compuesto bioactivo, en general mucho menos potente que la AII. Finalmente, la inactivación de las angiotensinas es conducida por la acción de varias peptidasas (Garrison, 1990). (ver ESQUEMA I).



ESQUEMA I. Síntesis y degradación de las diferentes angiotensinas.

Las acciones de la AII están mediadas por receptores específicos, que se localizan principalmente en la membrana plasmática de las células, aunque se ha descrito que también existen receptores para esta hormona en el núcleo de algunas células (Re y col. 1981; Re y col. 1984 y Tang y col. 1992). Los receptores para angiotensina II localizados en la membrana plasmática son capaces de activar diversos sistemas de transducción; algunos de ellos acoplándose a diferentes moléculas efectoras a través de proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina, denominadas proteínas "G". La AII es capaz de estimular el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio intracelular a través de la activación de una fosfolipasa C (Jonhson y Garrison, 1987; Enjalbert y col. 1986; Griendling y col. 1986; Kojima y col. 1986; Pfeilschifter y Bauer, 1986; Pfeilschifter, 1986; Lynch y col. 1985; Uhing y col. 1986), provoca la apertura de canales de calcio (Hausdorf y Catt, 1988; Cohen, 1988; Hescheler, 1988); es capaz de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa (D'Auriac y col. 1972; Jard y col. 1981; Cárdenas-Tanús y col. 1982; Anad-Srivastava, 1983; Pobiner y col. 1985; Marie y col. 1985), logra estimular a la fosfolipasa A2 y así aumentar la síntesis de eicosanoides (Garrison y Peach, 1990; Yamazaki y Toda, 1991) y además es capaz de estimular a la fosfolipasa D (Pfeilschifter y col. 1992).

En un principio, la serie enorme de acciones que ejerce la AII llevó a pensar en la existencia de diferentes receptores para esta hormona. Esta supuesta heterogeneidad de los receptores de AII se apoyó en las diferentes afinidades que AII y AIII presentan por sus receptores, su potencia relativa, y la susceptibilidad de

los receptores al bloqueo por antagonistas peptídicos.

Posteriormente, otra serie de datos pusieron de manifiesto la existencia de subtipos de receptores para AII. En primer lugar, se observó que en hígado, músculo liso de vasos sanguíneos y células de la pituitaria, la AII provoca la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, la estimulación del recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio. Además en la pituitaria y en el hígado, la toxina pertussis bloquea la habilidad de AII para inhibir la actividad de la adenilato ciclasa (Enjalbert y col. 1986; Lynch y col. 1985; Gunther, 1984), sin afectar sus acciones sobre el recambio de fosfoinosítidos (Pushpendran y col. 1983; Enjalbert y col. 1986; Pobiner y col. 1985; Lynch y col. 1985; Uhing y col. 1986; Johnson y col. 1986). Estos datos sugerían que existía una población de receptores de AII acoplados inhibitoriamente a la adenilato ciclasa a través de una proteína G sensible a la toxina y otra población de receptores acoplada al recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio a través de una proteína G insensible a la toxina. Sin embargo, se presentó una excepción en las células mesangiales de riñón de rata, en donde la toxina pertussis bloquea el recambio de fosfoinosítidos estimulado por AII (Enjalbert y col. 1986).

Se observó también que el ditiotreitól (DTT), un agente reductor de puentes disulfuro, bloqueaba las acciones vasoconstrictoras de AII en la aorta de conejo y disminuía la unión de AII a sus receptores en arterias meséntéricas de rata y en la corteza suprarrenal de bovino, señalando la existencia de puentes disulfuro críticos en la integridad funcional de algunos

receptores de AII. Así mismo, se observó que en el hígado las acciones de AII sobre el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio eran bloqueadas por el DTP, sin embargo no se alteraba la inhibición de la adenilato ciclasa inducida por AII (Gunther, 1984). Además se reportó que la unión de AII marcada a membranas plasmáticas de hígado presentaba sitios con alta y baja afinidad, y que el DTP disminuía notablemente el número de sitios de alta afinidad pero no los de baja afinidad (Gunther, 1984; Campanille y col. 1981; Crane y col. 1982). Estas observaciones sugirieron la existencia de al menos dos subtipos de receptores de angiotensina que podían ser diferenciados por el DTP (Chiu y col. 1989a).

No obstante estas evidencias surgía una cuestión: la AII ejercía sus acciones a través de un sólo tipo de receptor capaz de estimular a más de un sistema de transducción, o bien existían diferentes receptores para AII acoplados a sistemas diferentes (García-Sáinz, 1987a).

Una de las formas de resolver dicha cuestión implicaba purificar y caracterizar al receptor de AII. Varios grupos lo intentaron pero únicamente lograron solubilizarlo y obtener preparaciones parcialmente purificadas de los receptores. Rogers en 1984, identificó en corazón de bovino un componente de membrana de 116 kilodaltones (kDa), mientras que Sen y colaboradores (1983 y 1984) lograron solubilizar un receptor para AII con un peso aproximado entre 64 kDa y 68 kDa, en hígado de conejo. Debido a la falta de antagonistas selectivos, los intentos de purificación del receptor por cromatografía de afinidad fueron realizados usando como ligando a la AII, pero dado que esta hormona es

altamente susceptible a la proteólisis, se tuvieron que emplear métodos para disminuir su degradación, que implicaban una alteración del receptor purificado y por lo tanto una disminución de su capacidad para unir un ligando. Desafortunadamente la inestabilidad y los bajos niveles de expresión de los receptores de AII, se opusieron a los esfuerzos de purificación del receptor.

Por otro lado, la caracterización de los subtipos de receptores de AII también se ha visto obstaculizada por la carencia de análogos estables adecuados. En cuanto al diseño de antagonistas de AII, este se ha desarrollado durante más o menos 20 años. Sin embargo, los antagonistas que se habían logrado obtener, todos eran análogos peptídicos de AII.

Hasta ahora, la estructura de la AII en sí misma ha servido como la única base para el desarrollo adecuado de antagonistas de AII. Se han sintetizado muchos análogos de AII y se ha observado que la actividad de la hormona depende del heptapéptido carboxilo terminal. La fenilalanina en posición 8 es crítica, se ha demostrado que la sustitución de este aminoácido por aminoácidos alifáticos es suficiente para suprimir la actividad, es decir, darle capacidad antagónica a los análogos de AII. Se piensa que los residuos aromáticos, tirosina e histidina, en posiciones 4 y 6; el grupo guanido de la arginina en posición 2 y el carboxilo terminal de la AII, participan en la unión de la hormona al receptor. El aspártico en la posición 1 no es crítico y puede ser reemplazado, por ejemplo con sarcosina (N-metilglicina); esto, combinado con una sustitución de la fenilalanina en posición 8 por alanina o isoleucina, produce un potente antagonista de AII, la

saralasinina. La saralasinina tiene una mayor afinidad por el receptor que la AII y su degradación es más lenta. La saralasinina y análogos relacionados con sustituciones carboxilo terminales compiten con AII por sus receptores, y en ausencia de AII, estos análogos se comportan como débiles agonistas parciales (Garrison y Peach, 1990).

Una de las principales razones que impulsaron el desarrollo de antagonistas selectivos para los receptores de AII, fué la necesidad de obtener un compuesto capaz de bloquear al sistema renina-angiotensina a nivel de su hormona activa, la AII. Esto permitiría obtener compuestos potencialmente útiles en la terapia de algunas enfermedades cardiovasculares.

La inhibición farmacológica del sistema renina-angiotensina se logró en 1971, con el descubrimiento de la saralasinina. Este antagonista, aunque reduce la presión arterial en pacientes hipertensos con altos niveles de renina, tiene un potencial terapéutico limitado, ya que posee una vida media muy corta, no es oralmente bioactivo y posee ciertas propiedades de agonista.

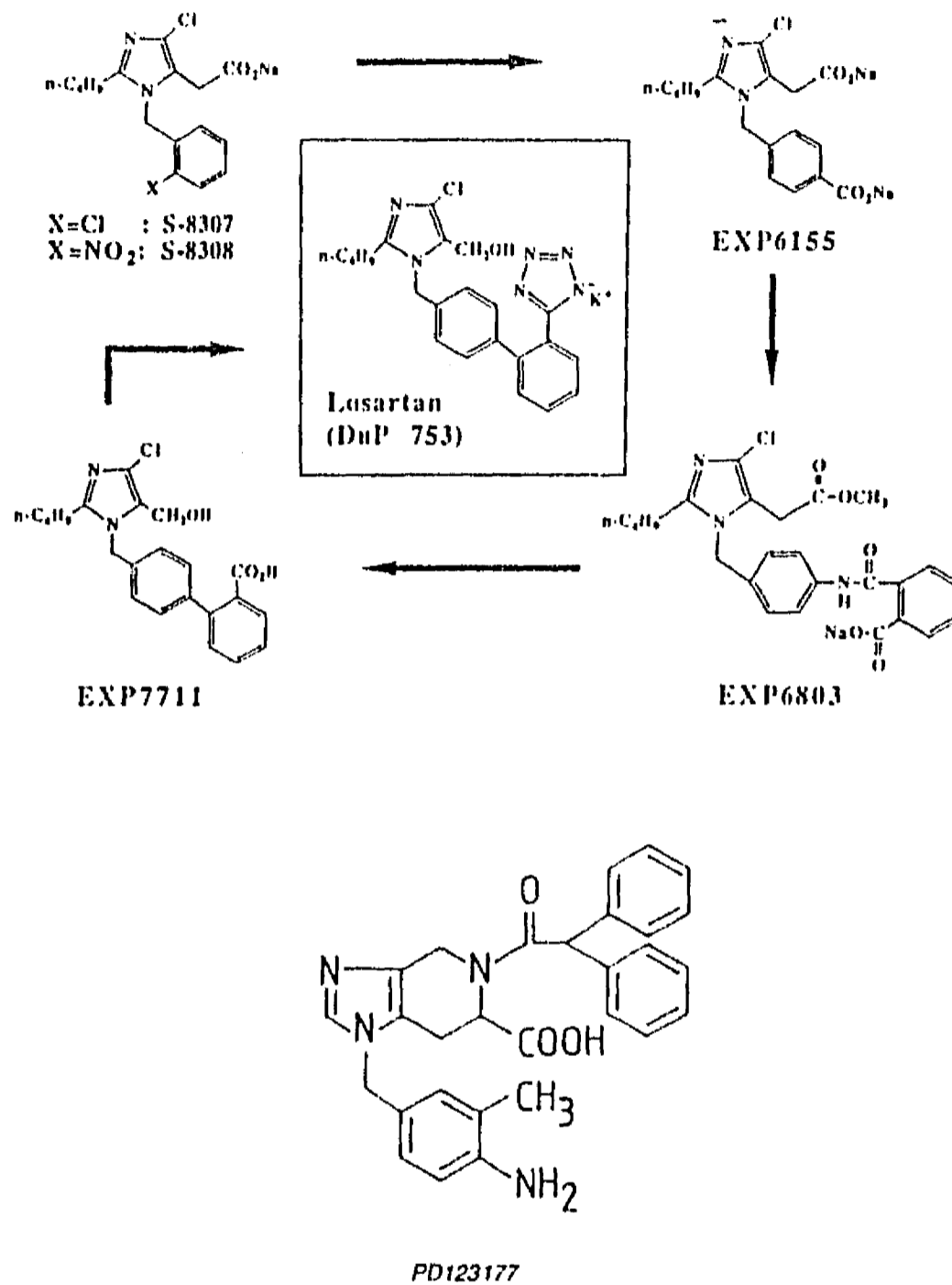
A pesar del considerable esfuerzo realizado, hubo poco progreso en el desarrollo de antagonistas no peptídicos de AII, hasta la aparición de dos patentes concedidas a Y. Furukawa y colegas. Este grupo reportó que algunos análogos del imidazol, tales como el S8307 y S8308 (ver ESQUEMA II), poseían propiedades de antagonistas para AII. Estos simples derivados del imidazol exhibían un antagonismo competitivo hacia AII a concentraciones que tienen poca o ninguna influencia sobre los efectos de otros estímulos, lo cual sugería que eran antagonistas de AII débiles, pero selectivos y competitivos, sin tener características de

agonista (Wong y col. 1988).

Debido a los problemas presentados al usar fragmentos de AII como patrones o modelos para el diseño de análogos no peptídicos y con base en los hallazgos del grupo de Furukawa, el grupo de la compañía farmacéutica DuPont Merck empleó como estrategia de diseño el modelaje por computadora usando como patrón compuestos imidazólicos; logrando producir el compuesto EXP6155 (Chiu y col. 1989c). Sin embargo, aunque este compuesto poseía una mayor afinidad y potencia que sus predecesores no podía ser administrado oralmente, por lo cual se le hicieron algunas modificaciones, hasta lograr un bifenil derivado, el EXP7711, el cual fué el primer compuesto oralmente activo (ver ESQUEMA II).

Los antagonistas no peptídicos de AII que se siguieron sintetizando resultaron ser compuestos con mejoras en la actividad oral y en la duración de sus acciones. Los esfuerzos realizados culminaron en la identificación del candidato clínico Losartan (DuP753) (Chiu y col. 1990a). Los experimentos hechos con Losartan mostraron que era un antagonista no peptídico de la AII competitivo, potente, oralmente activo, selectivo y con una acción de larga duración (Wong y col. 1990c,d) (ver ESQUEMA II).

En fecha posterior, apareció una patente concedida a Blankley y col. de la Warner-Lambert Co., quienes presentaron el compuesto EXP655 (PD123177) (ESQUEMA II), un análogo estructural del S-8308, que mostraba ser un agente antihipertensivo con alta afinidad por los receptores de AII (Wong y col. 1990a). Sin embargo, cuando el grupo de la Du Pont, lo utilizó para compararlo con Losartan, observaron que no era capaz de antagonizar la



ESQUEMA II. Estructura química de algunos antagonistas no peptídicos de los receptores de angiotensina II. (Tomado de Wong y col. 1992).

contracción de aorta de conejo, ni de disminuir la presión sanguínea de ratas hipertensas. No obstante estas observaciones, este grupo intentó caracterizar los subtipos de receptores de AII en las glándulas suprarrenales de rata utilizando cuatro antagonistas de AII: la saralasin, el S-8308, Losartan y PD123177. Utilizando técnicas de unión de radioligando y autorradiografía, lograron demostrar por primera vez la existencia de dos subtipos de receptores de AII en este tejido. La identificación de los subtipos fué posible gracias a que Losartan y el EXP655 mostraron selectividad. Los resultados obtenidos en los estudios realizados en las glándulas suprarrenales de rata condujeron a proponer que los receptores de AII sensibles a Losartan se designaran como sitios AII-1 y los sensibles al EXP655 (PD123177) se conocieran como sitios AII-2 (Chiu y col. 1989b y 1990b).

A partir de la publicación de estos resultados, varios grupos de investigadores empezaron la caracterización de los receptores de AII en diferentes tejidos, utilizando estos compuestos como herramientas en la identificación de los subtipos de receptores de AII y en el estudio de su significado funcional.

Nosotros realizamos la caracterización del subtipo de receptores de angiotensina II presente en el hígado de rata. Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente trabajo:

TRABAJO 1.

- García-Sáinz, J.A. and M. Macías-Silva. (1990) Angiotensin II stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylase through AII-1 receptors in isolated rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172 (2): 780-785.

RESUMEN DE RESULTADOS DEL TRABAJO 1.

Utilizando como modelo a los hepatocitos de rata pudimos observar que:

- 1) La angiotensina estimula, de una manera dependiente de la dosis, la actividad de la fosforilasa a. Esta enzima es clave en el metabolismo del glucógeno y en la producción de glucosa en el hígado.
- 2) La activación de la fosforilasa a por la angiotensina II, es bloqueada por dosis crecientes de DuP753 (Losartan, un antagonista de los receptores AII-1). No se observaron efectos del PD123177 (un antagonista de los receptores AII-2).
- 3) La angiotensina II es capaz de estimular el marcaje de fosfatidilinositol y la producción de fosfatos de inositol. Además, observamos que el DuP753 (Losartan) inhibe estas acciones, sin observar un efecto del PD123177.

ANGIOTENSIN II STIMULATES PHOSPHOINOSITIDE TURNOVER AND PHOSPHORYLASE
THROUGH AII-1 RECEPTORS IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES

J. Adolfo García-Sáinz and Marina Macías-Silva

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

Received August 31, 1990

Angiotensin II stimulated the activity of phosphorylase α ($EC_{50} \approx 3$ nM). The effect of two receptor subtype-selective nonpeptide antagonists, DuP 753 (AII-1 selective) and PD123177 (AII-2 selective), was studied. It was observed that DuP 753 inhibited the effect of angiotensin II (IC_{50} 100 nM) but in contrast, PD123177 was without effect on this action of the peptide hormone. Angiotensin II stimulated the labeling of phosphatidylinositol (resynthesis) and the release of inositol phosphates (breakdown). These effects of angiotensin II were blocked by DuP 753 but not by PD123177. The antagonists were without effect by themselves on these parameters. The results clearly indicate that angiotensin II receptors of the AII-1 subtype are coupled to phosphoinositide turnover and mediate phosphorylase activation in isolated rat hepatocytes. © 1990 Academic Press, Inc.

Angiotensin II is a very active peptide hormone which elicits a large variety of physiological effects by modulating the function of the cardiovascular system, liver, kidney, brain, adrenal gland, pituitary and other organs (1). The actions of angiotensin II are initiated by its interaction with specific receptors located in the plasma membrane. The possibility that the angiotensin receptors could be heterogeneous has been extensively suggested (2-6) and the fact that these receptors are coupled to more than one signal transduction system has also been noted (6 and references therein). However, compelling evidence for receptor subtypes was not available until very recently (7-10) and it is still unclear whether a single type of angiotensin II receptors can interact with several transduction systems or if receptor subtypes interact selectively with specific signal transducers (6).

The development of selective nonpeptide angiotensin II receptor antagonists has allowed the unambiguous demonstration of angiotensin II receptor subtypes (7-10). DuP 753 and PD123177 (also known as EXP655) are the

prototypic and subtype-specific tools for unraveling the functions of the angiotensin II receptors (9). It has been suggested that the angiotensin II receptors sensitive to DuP 753 be designated as AII-1 sites and those sensitive to PD123177 be known as AII-2 sites (9).

We have characterized the angiotensin II receptors involved in activation of liver phosphorylase using these selective antagonists. Our results unambiguously indicate that these receptors belong to the AII-1 subtype. In addition, our data show that these receptors are coupled to the phosphoinositide turnover transduction system.

MATERIALS AND METHODS

Angiotensin II was obtained from Sigma Chemical Co. DuP 753 and PD123177 were generous gifts of Drs. A. Chiu and R. D. Smith (Du Pont). [2-³H]-Myo inositol (20 Ci/mmol), α -D-[U-¹⁴C]glucose-1-phosphate (313 mCi/mmol) and [³²P]Pi (carrier free) were obtained from New England Nuclear. The anion exchange resin AG 1-X8 (formate form) was from Bio Rad. Collagenase was from Worthington.

Experiments were performed with female Wistar rats (200-250 g) fed ad libitum. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (11). The cells (30-40 mg wet weight) 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.

To quantify phosphorylase a activity, the cells were preincubated for 20 min, then the agents were added and 1 min later the reaction was stopped. Phosphorylase a activity was assayed as described by Stalmans and Fiers (12) and it is expressed in units. One unit of enzyme activity is defined as the conversion of 1 μ mol of substrate to product in 1 min per g of cells wet weight.

Phosphatidylinositol labeling was studied as described previously (13). Production of inositol phosphates was studied as described by Charest et al (14) with small modifications. In brief, the cells were incubated for 90 min with 15 μ Ci/ml of tritiated inositol, washed and incubated for 10 min with 10 mM LiCl; the hormones were added and after 5 min of incubation the reaction was stopped. Inositol phosphates were separated by anion exchange chromatography as described by Berridge et al (15).

RESULTS

Angiotensin II induces a dose-dependent increase in phosphorylase a activity; the EC₅₀ was approximately 3 nM (Fig 1). The two angiotensin II antagonists tested, DuP 753 and PD123177 were without effect by themselves (data not shown). However, DuP 753 inhibited dose-dependently the effect of angiotensin II; the IC₅₀ was approximately 100 nM (Fig 1). In contrast,

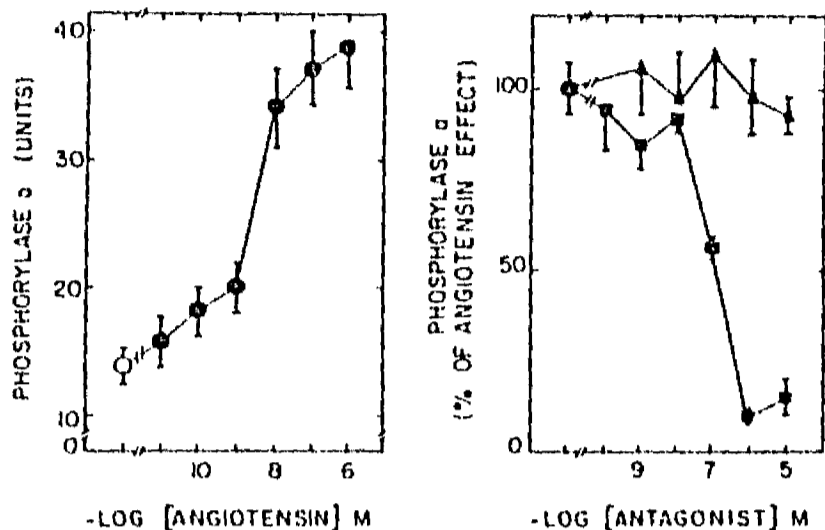


Figure 1. EFFECT OF ANGIOTENSIN II, DuP 753 AND PD123177 ON PHOSPHORYLASE α ACTIVITY. Left Panel: cells were incubated in the absence (open circle) or presence (closed circles) of different concentrations of angiotensin II. Right panel: cells were incubated in the presence of 10 nM angiotensin II alone (closed circle) or with different concentrations of DuP 753 (closed squares) or PD 123177 (closed triangles). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 6-8 experiments in duplicate.

PD123177 was completely unable to antagonize the effect of angiotensin II on this parameter up to a concentration of 10 μ M (Fig 1).

The effects of angiotensin II and the antagonists on phosphoinositide turnover were studied. It was observed that the vasopressor peptide increased the labeling of phosphatidylinositol with [32 P]PI approximately 2-fold and that this effect was completely blocked by DuP 753; PD123177 was without effect on this action of angiotensin II (table I). Similarly, angiotensin II increased the production of inositol phosphates (IP₁, IP₂, IP₃) and this effect was blocked by DuP 753 but not by PD123177 (Table 1). The elution profile of inositol phosphates of a typical experiment is shown in Fig 2.

DISCUSSION

The ability of angiotensin II to increase phosphorylase α via a calcium-dependent cyclic AMP-independent mechanism in liver cells has been known for some time (16). Similarly, the ability of the vasopressor peptide to stimulate phosphoinositide turnover has been studied (13,14). Therefore, liver cells offer a model system in which a metabolic effect of angiotensin II and a signal transduction system can be studied. The recent availability of selective

TABLE 1
EFFECT OF ANGIOTENSIN II, DUP 753 AND PD 123177 ON PHOSPHOINOSITIDE TURNOVER

Condition	PI labeling	Inositol phosphates (cpm/40 mg cells w.w.)		
	(cpm/mg cells w.w.)	IP ₁	IP ₂	IP ₃
Basal	118 ± 3	2870 ± 270	1500 ± 70	885 ± 45
Angiotensin II 100 nM	230 ± 12 ^a	4400 ± 250 ^c	4890 ± 445 ^d	2320 ± 125 ^a
Angiotensin II 100 nM + DuP 753 10 μM	114 ± 10 ^b	3000 ± 190 ^d	1540 ± 40 ^e	890 ± 30 ^e
Angiotensin II 100 nM + PD 123177 10 μM	191 ± 20 ^d	4340 ± 260 ^c	4410 ± 490 ^d	2230 ± 290 ^d
DuP 753 10 μM	100 ± 8	3100 ± 180	1654 ± 155	960 ± 50
PD 123177 10 μM	93 ± 7	3200 ± 150	1565 ± 95	925 ± 20

Results are the means ± S.E.M. of 3-5 experiments in duplicate. PI, phosphatidylinositol.

a p < 0.001 vs basal

b p < 0.001 vs angiotensin II

c p < 0.005 vs basal

d p < 0.005 vs angiotensin II

e p < 0.001 vs angiotensin II

antagonists that permit the clear differentiation of receptor subtypes, prompted us to characterize the type of receptor involved in these effects of angiotensin II. To the best of our knowledge this is the first demonstration

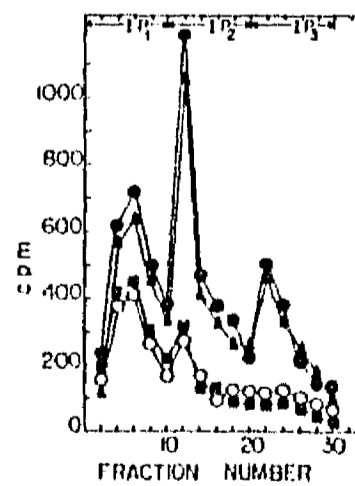


Figure 2. ELUTION PROFILE OF INOSITOL PHOSPHATES (IP₁, IP₂, IP₃). Cells were incubated in the absence of any agent (open circles) with 100 nM angiotensin II (closed circles), with 100 nM angiotensin II + 10 μM DuP 753 (closed squares) or with 100 nM angiotensin II + 10 μM PD 123177 (closed triangles). Data from a representative experiment.

that the angiotensin II-1 receptor is coupled to the phosphoinositide transduction system.

There is evidence that in liver cells angiotensin II can decrease the cyclic AMP accumulation induced by glucagon (3-5, 17). A series of indirect evidences such as the calcium-dependency or the sensitivities to thiols and to pertussis toxin suggest that a different type of angiotensin II receptor may mediate this effect (4,5,17). Although these evidences are very provocative, there is no direct demonstration yet. The availability of the selective antagonists may allow such differentiation. Experiments are in progress to elucidate this point.

Recently, Speth and Kim (10) using radioligand binding assays observed that DuP 753 competes with ^{125}I -sarcosine¹, isoleucine⁸ angiotensin II with very high affinity ($\text{IC}_{50} \approx 55 \text{ nM}$) which is in close agreement with our present data. Furthermore, these authors observed that the competition curve was monophasic with a Hill coefficient of 1.02 which suggests that this subtype of angiotensin II receptor largely predominates in liver cells. Gunther (5) previously observed that the stimulation of phosphorylase by angiotensin II was completely inhibited by dithiothreitol. Previously, Sen (18) presented evidences of essential disulfide bonds in angiotensin II binding sites of hepatic membranes. Chiu et al (8) observed that this thiol discriminates angiotensin II receptor subtypes and suggested that the dithiothreitol-sensitive receptors may mediate calcium-mobilizing responses. The data of these authors are in close agreement with our findings.

In summary our data unambiguously demonstrate that angiotensin II receptors of the AII-1 subtype mediate the stimulation of phosphoinositide turnover and activation of phosphorylase a by the peptide hormone in liver cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Chiu and Smith for making available to us the angiotensin II antagonists and Ms. Guadalupe Ramirez for skillfully typing the manuscript. This research was partially supported by a Grant from DGAPA (IN 021889).

REFERENCES

1. Douglas, W. W. (1980) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, pp. 647-667, MacMillan Publishing Co., Inc. New York.
2. Regoli, D. (1979) *Can. J. Phys. Pharm.* 57, 129-139.
3. Jard, S., Cantau, B. and Jakobs, K. H. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 2603-2606.
4. Cárdenas-Tanús, R., Huerta-Bahena, J. and García-Sáinz, J. A. (1982) *FEBS Lett.* 143, 1-5.
5. Gunther, S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7622-7629.
6. García-Sáinz, J.A. (1987) *Trends Pharmacol. Sci.* 8, 48-49a.
7. Chiu, A.T., Duncia, J.V., McCall, D.E., Wong, P.C., Price, W.A., Thoolen, M.J.M.C., Carini, D.J., Johnson, A.L. and Timmermans, P.B.M.W.M. (1989) *J. Pharm. Exptl. Ther.* 250, 867-874.
8. Chiu, A.T., McCall, D.E., Nguyen, T.T., Carini, D.J., Duncia, J.V., Herblin, W.F., Uyeda, R.T., Wong, P.C., Wexler, R.R., Johnson, A.L. and Timmermans, P.B.M.W.M. (1989) *Eur. J. Pharm.* 170, 117-118.
9. Chiu, A.T., Herblin, W.F., McCall, D.E., Ardecky, R.J., Carini, D.J., Duncia, J.V., Pease, L.J., Wong, P.C., Wexler, R.R., Johnson, A.L. and Timmermans, P.B.M.W.M. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 196-203.
10. Speth, R.C. and Kim, K.H. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 997-1006.
11. Berry, M.N. and Friend, D.S. (1969) *The Journal of Cell Biology* 43, 506-520.
12. Stalmans, W. and Hers, H.-G. (1975) *Eur. J. Biochem.* 54, 341-350.
13. García-Sáinz, J.A. (1987) *Circ. Res.* 61 (suppl. 11) 1-5.
14. Charest, R., Prpic, V., Exton, J.H. and Blackmore, P.F. (1985) *Biochem. J.* 227, 79-90.
15. Berridge, M.J., Dawson, R.M., Downes, P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1983) *Biochem. J.* 212, 473-482.
16. Hems, D.A., Rodrigues, L.M. and Whitton, P.D. (1978) *Biochem. J.* 172, 311-317.
17. Pober, B.F., Hewlett, E.L. and Garrison, J.C. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 16200-16209.
18. Sen, I. (1985) *Biochim. et Biophys. Acta* 813, 103-110.

ANALISIS DE LOS RESULTADOS DEL TRABAJO 1.

La angiotensina II es una de las principales hormonas peptídicas que regulan el metabolismo hepático. Se sabe que esta hormona ejerce sus acciones a través de receptores localizados en la membrana plasmática. Los estudios que se han hecho sobre las acciones de angiotensina en el hígado han mostrado que esta hormona disminuye los niveles de AMP cíclico y que también estimula el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio.

Las diferentes acciones que ejerce la angiotensina fueron la primera evidencia para sugerir una heterogeneidad de los receptores de esta hormona en el hígado. Posteriormente, otra serie de evidencias apoyaron esta idea, entre ellas destacan las sensibilidades a toxina pertussis y a agentes reductores de puentes disulfuro como el ditiotreitól (DTT). Los resultados obtenidos por varios grupos muestran que en el hígado de rata existen al menos dos receptores para angiotensina II, uno acoplado de manera inhibitoria a la adenilato ciclasa a través de una proteína G sensible a toxina pertussis e insensible al DTT y otro acoplado al recambio de fosfoinosítidos a través de una proteína G insensible a la toxina pertussis, pero sensible al DTT.

La idea de que la angiotensina II pudiera ejercer sus acciones a través de dos receptores acoplados a sistemas de transducción diferentes o bien a través de un receptor acoplado a dos sistemas diferentes, no era posible dilucidarla hasta no disponer de antagonistas selectivos que pudieran diferenciar a los receptores de angiotensina II.

La síntesis de dos antagonistas no peptídicos, pero selectivos, permitía por primera vez tratar de abordar el problema. Los datos encontrados por nosotros muestran que las acciones que tiene la angiotensina II sobre la activación de la fosforilasa a y la estimulación del metabolismo de fosfoinosítidos fueron inhibidas por el antagonista no peptídico Losartan (DuP 753), sin observarse efecto del antagonista no peptídico PD 123177. Los efectos que tienen estos dos antagonistas selectivos de angiotensina II en los hepatocitos de rata, señalan claramente que los receptores de angiotensina II del tipo AII-1 (sensibles al DuP 753) están acoplados al recambio de fosfoinosítidos y a la activación de la fosforilasa a. Sin embargo, no se exploró el efecto de estos antagonistas en las acciones que la AII ejerce sobre la inhibición de la adenilato ciclasa.

Debido a la inconsistencia en la nomenclatura utilizada para los receptores de AII, en 1990, se adoptó una clasificación estándar propuesta por un Comité de la American Heart Association, designado para establecer la nomenclatura de los receptores de AII. En esta reunión se designó a los sitios denominados AII-B, AII-1 o AII-alfa como AT1 y los denominados AII-A, AII-2 o AII-beta como AT2. De tal forma que los receptores que nosotros describimos en nuestro trabajo como AII-1 corresponden actualmente a los receptores AT1.

Paralelamente, a nuestro trabajo Speth y Kim (1990) realizando estudios de asociación con radioligandos, observaron que el DuP 753 compite con una alta afinidad con la AII-[I125] en membranas de hígado, además observan que la curva de competencia

tiene un coeficiente de Hill de 1.02, sugiriendo que los receptores AT1 son los predominantes en el hígado de rata.

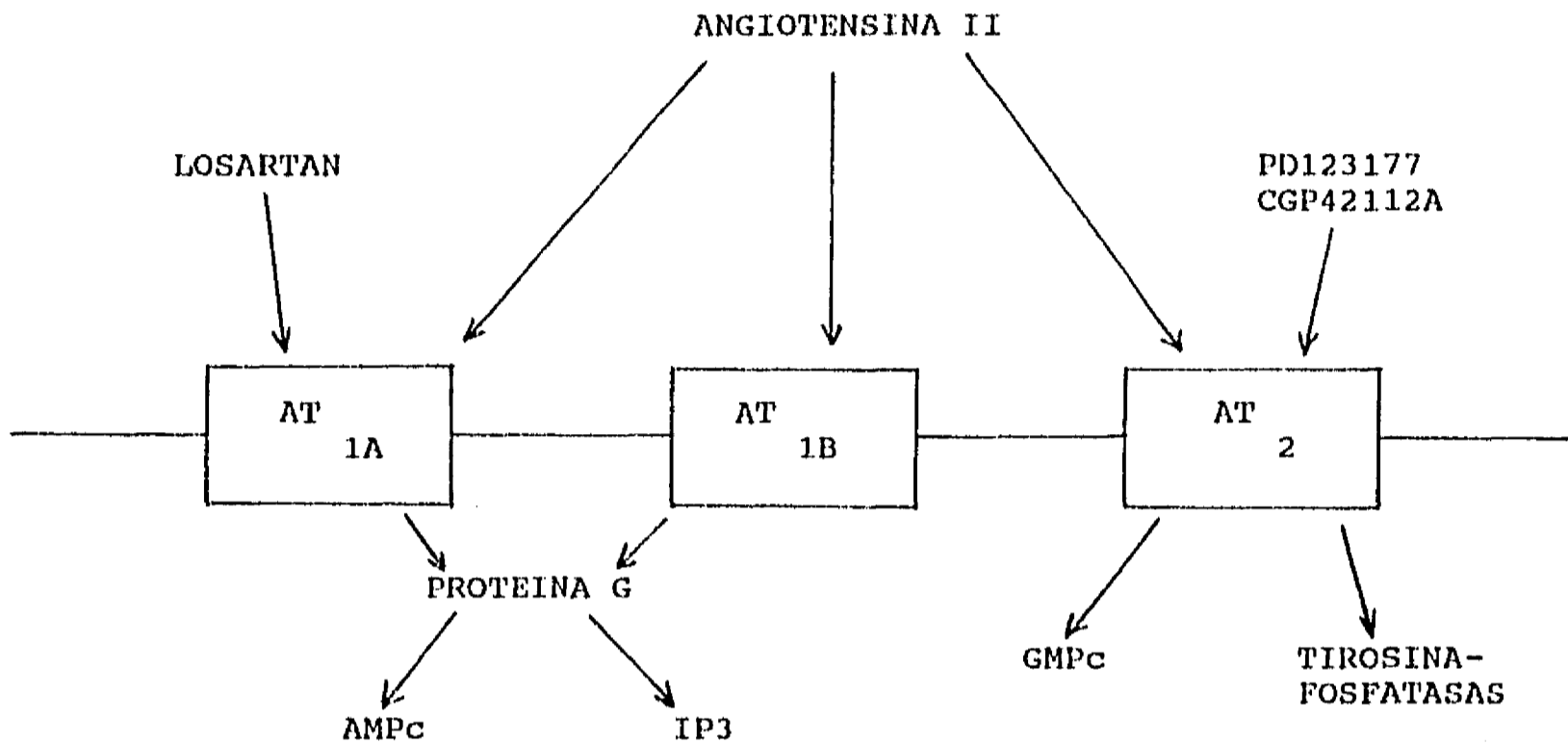
Posteriormente, Bauer y col. en 1991 confirman nuestros datos y además encuentran que los receptores AT1 también se acoplan de manera inhibitoria a la adenilato ciclasa. Esto planteaba ahora la idea de si el mismo tipo de receptor AT1 activa a dos sistemas de transducción diferentes o si existen subtipos de receptores AT1 con acciones diferentes en el hígado de rata. Esto aún no ha sido dilucidado, sin embargo, recientemente se clonaron dos subtipos de receptores AT1: AT1A y AT1B. Ambos tienen una alta homología y se encuentran presentes en hígado de rata. Además, se ha logrado expresar al subtipo AT1A en células CHO (células de ovario de hamster chino) y se encontró que este receptor es capaz de acoplarse a tres sistemas de transducción diferentes: el recambio de fosfoinosítidos, la inhibición de la adenilato ciclasa y la modulación de canales de calcio sensibles a dihidropiridinas. Desafortunadamente, se desconoce si esto ocurre de manera natural en algún tipo celular (Iwai e Inagami, 1992; Ohnishi y col., 1992), y por otro lado los sistemas de transducción a los cuales se encuentra acoplado el subtipo AT1B no se conocen hasta el momento.

El hecho de que el receptor AT1A sea capaz de acoplarse a tres sistemas de transducción diferentes, apoya la idea de que en hígado de rata pudiera existir un subtipo de receptor de AII capaz de acoplarse a varios sistemas de transducción. Sin embargo, los datos con DTT, anteriormente mencionados, no apoyan esta idea.

Actualmente se sabe que los receptores AT1 son afines a las angiotensinas con el siguiente orden de potencia:

AII=saralasin>AIII>>AI, mientras que para los sitios de unión AT2 el orden es: AIII>AII=saralasin>>AI, considerándose como uno de los agonistas peptídicos más selectivos para los sitios AT2 a la pNH2FAII (para-amino-fenilalanina-angiotensina II). La especificidad de los antagonistas no peptídicos para los sitios AT1 es Losartan>>EXP7711>>S-8308>PD123177 y para los sitios AT2, el antagonista no peptídico más selectivo es el PD123177 y el antagonista peptídico más selectivo es el CGP42112A. (ver TABLA I).

Además de sus diferencias farmacológicas, los subtipos de receptores de AII también presentan diferencias en sus mecanismos de transducción celular: El receptor AT1 está asociado con el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio intracelular (García-Sáinz y Macías-Silva, 1990; Dudley y col. 1990; Bauer y col. 1991); también se asocia a la inhibición de la adenilato ciclasa (Bauer y col. 1991) probablemente a través de la proteína Gi3 (Pobiner y col. 1991); además, recientemente se vio que estaba también acoplado a la estimulación de la Fosfolipasa D (Pfeilschifter, 1992). Los receptores AT1 se acoplan a diferentes efectores a través de proteínas G, son sensibles a agentes reductores como el DTT y dependiendo del sistema celular, es decir, al tipo de proteínas G que expresan, pueden o no ser sensibles a la toxina pertussis. En cuanto al receptor AT2, aún no se ha identificado su función fisiológica, pero se ha asociado con una modulación de los niveles de GMP cíclico (Sumners y col. 1991) (ver ESQUEMA III). Además, estos receptores son resistentes a agentes reductores de grupos sulfhidrilo y no parecen interactuar con proteínas G (Bottari y col. 1991) (TABLA I).



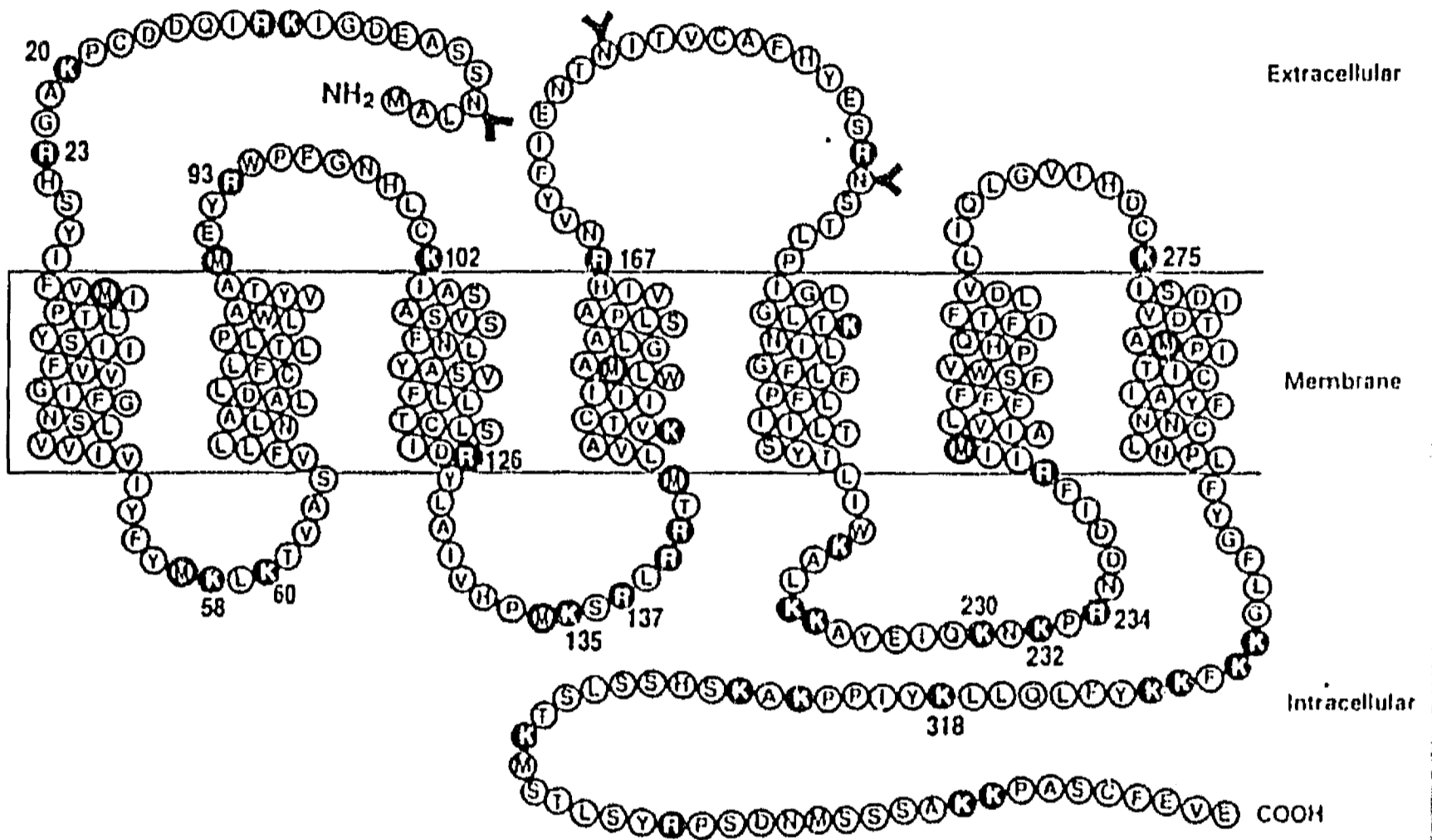
ESQUEMA III. Angiotensina II: Subtipos de receptores (AT_{1A}, AT_{1B} y AT₂); antagonistas selectivos (Losartan, PD123177 y CGP42112A); y sistemas de segundos a los que se encuentra acoplados (AMPC, IP₃, GMPC y Tirosinafosfatasas).

TABLA I. Propiedades de los receptores de Angiotensina II.

	AT1	AT2
AFINIDADES DE UNION		
Antagonistas		
Saralasin	alta	alta
DuP753	alta	baja
PD123177	baja	alta
CGP42112A	baja	alta
Agonistas		
AII, AIII [pNH ₂ -Phe ₆]AII	alta (AII>AIII) baja	alta (AIII>AII) alta
SENSIBILIDAD A DTT	alta	baja
ACOPLAMIENTO A PROTEINAS G	SI	NO
SISTEMA DE TRANSDUCCION	+ Recambio PI/Ca ⁺⁺ - Adenilato ciclasa + Fosfolipasa D	+/- GMPC + Canales de Ca ⁺⁺ ?

(+) Estimulación ó (-) Inhibición.

Recientemente, dos grupos lograron exitosamente la clonación de un receptor de AII, ambos usando estrategias de clonación por expresión para obtener los cDNAs. El receptor reportado por Sasaki y col. en 1991, se obtuvo de células en cultivo de la zona glomerulosa de glándulas suprarrenales de bovino, y el reportado simultáneamente por Murphy y col. 1991, se obtuvo de células de músculo liso vascular de aorta de rata, siendo ambos tejidos ricos en sitios AT1. Estos receptores poseen una estructura con siete dominios transmembranales típica de los receptores acoplados a proteínas G (ver ESQUEMA IV), y entre sí son virtualmente idénticos en estructura (~92%), demostrando que el gen se expresa similarmente en diferentes tejidos y se ha conservado entre distintas especies de mamíferos. El receptor AT1 consiste de 359 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 41 kDa, contiene 3 sitios potenciales de N-glicosilación, uno en la región extracelular amino terminal y dos en la tercer asa extracelular. Los residuos de cisteína están presentes en cada uno de los cuatro dominios extracelulares y son probablemente importantes en la formación de puentes disulfuro necesarios para la conformación que permite unir al ligando, y en la sensibilidad de los AT1 a los agentes reductores. Los AT1 presentan un residuo de cisteína en el extremo carboxilo como posible sitio de palmitoilación. Varios residuos de serina y treonina considerados como posibles sitios de fosforilación, se presentan en la segunda asa intracelular y en el dominio citoplásmico carboxilo terminal, este último también contiene tres residuos de tirosina. Los receptores AT1 clonados exhiben perfiles de unión a ligandos similares, pero no idénticos, cuando se expresan en células COS-7, mostrando que conservan la



ESQUEMA IV. Secuencia de aminoácidos del receptor AT1 clonado.

(Tomado de Desarnaud y col. 1993).

farmacología descrita para el receptor AT1. Ninguno une el compuesto PD123177, selectivo de los AT2, pero ambos unen con alta afinidad a Losartan y al compuesto, no selectivo, saralasin. El orden de potencia de la unión de los agonistas al receptor fue idéntica: AII>AIII>AI. Manteniendo el perfil de los receptores AT1, los receptores clonados se acoplan a la fosfolipasa C y a la movilización de calcio.

Finalmente, es importante señalar que hasta no disponer de antagonistas más selectivos que nos permitan diferenciar entre los subtipos de receptores AT1, no podemos establecer si son uno o más los receptores de angiotensina que modulan importantes vías metabólicas en el hígado, tales como la glucogenólisis, la ureogénesis o la gluconeogénesis.

PARTE II

SISTEMAS DE TRANSDUCCION Y FOSFORILACION DE PROTEINAS.

Actualmente está claro que muchas hormonas y neurotransmisores, actuando a través de distintos sistemas de transducción, median sus acciones fisiológicas alterando la fosforilación de proteínas específicas, y que esta modificación postraducciona es un mecanismo regulador muy importante en diversos procesos como la motilidad, el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación (Shenolikar, 1988).

La fosforilación o desfosforilación de residuos de serina, treonina o tirosina dispara cambios conformacionales en algunas proteínas, alterando sus propiedades biológicas, de tal manera que el nivel de fosforilación en cualquier instante de la vida celular refleja las actividades relativas de las cinasas y fosfatasas de proteínas que participan en los diversos procesos celulares. Así resulta que el análisis de los pasos moleculares involucrados en las respuestas fisiológicas a las hormonas y neurotransmisores, ha llegado a ser más complicado de lo que se esperaba.

Por otro lado, se sabe que existe una red de intercomunicación entre los diferentes sistemas de segundos mensajeros. Esto añade otro grado de complejidad al estudio de la transducción de las señales hormonales y de su regulación. Además, esta intercomunicación se atribuye en parte a la fosforilación de proteínas, ya que se ha observado que esta modificación postraducciona lleva a la modulación de la función de los receptores, los niveles de segundos mensajeros y la actividad de proteínas blanco comunes. Es aquí donde la modulación

farmacológica de la fosforilación de proteínas ha producido información útil sobre los eventos moleculares involucrados.

Actualmente se dispone de una serie de agentes farmacológicos que permiten estudiar la regulación de los sistemas de transducción por la fosforilación de proteínas. Dicho estudio puede ser abordado a dos niveles: 1) modulando la actividad de las diferentes cinasas de proteínas y/o 2) activando o inhibiendo las fosfatasas de proteínas. Esto ha podido realizarse gracias a que se han descubierto una gran cantidad de moduladores de la actividad de cinasas y de fosfatasas de proteínas.

Numerosos estudios se han realizado sobre las acciones que las cinasas de proteínas ejercen sobre los receptores y las señales biológicas que transmiten, pero se ha descrito poco sobre el papel que las proteínas fosfatasas juegan en la transducción de señales hormonales. Además el estudio de la fosforilación en residuos de serina o treonina ha recibido mayor atención que el de la fosforilación en residuos de tirosina. Aunque recientemente este último campo ha empezado a despertar mayor interés. Sin embargo, en este caso nos enfocaremos a la importancia de la fosforilación en residuos de serina o treonina.

El uso de diversos inhibidores de fosfatasas de residuos de serina ó treonina, ha sido muy útil en los estudios sobre la importancia de la fosforilación de proteínas. Algunos de estos inhibidores como el pirofosfato, el β -glicerofosfato, el fluoruro de sodio, y el vanadato de sodio sirven para mantener el estado fosforilado de las proteínas en extractos celulares y evitan la interferencia de fosfatasas de proteínas en los ensayos de cinasas

de proteínas. Todos estos inhibidores son inespecíficos, por lo tanto únicamente han favorecido una expansión del campo de las cinasas de proteínas y no del de las fosfatasas de proteínas (Cicirelli, 1992).

En cuanto al campo de las proteínas serina/treonina fosfatasas, este se ha desarrollado poco. Inicialmente, estas enzimas fueron divididas en dos grupos, el tipo 1 y el tipo 2. Las proteínas fosfatasas tipo 1 (PP1) preferencialmente desfosforilaban la subunidad β de la fosforilasa cinasa y eran inhibidas por dos pequeñas proteínas estables al ácido y al calor, denominadas inhibidor 1 (I1) e inhibidor 2 (I2). Las proteínas fosfatasas del tipo 2 (PP2) preferían desfosforilar la subunidad α de la fosforilasa cinasa y eran insensibles a los inhibidores 1 y 2. Las PP2 a su vez se han subdividido en tres enzimas distintas, PP2A, PP2B y PP2C, con base en su dependencia por ciertos cationes divalentes. Las PP2B y PP2C tienen un requerimiento absoluto por calcio y magnesio, respectivamente, mientras que la PP2A (así como la PP1) es activa para algunos sustratos en ausencia de cationes divalentes. Se ha observado también que los cuatro tipos de fosfatasas se encuentran ampliamente distribuidos en las células de mamíferos (Cohen, 1989 y 1991).

Además de ayudar a la categorización de las proteínas fosfatasas, los inhibidores 1 y 2, han sido útiles en la demostración de que las proteínas fosfatasas son reguladas o cambian en respuesta a hormonas y factores de crecimiento. Desafortunadamente, estos inhibidores no están disponibles comercialmente, además de estar limitados a estudios in vitro y de no inhibir a todos los tipos de PP1. Recientemente, una nueva

generación de inhibidores de proteínas fosfatasas ha sido aislada de varios microorganismos y está disponible comercialmente. Estos inhibidores, el ácido okadaico, la microcistina-LR, la caliculina A y la tautomocina, parecen entrar a las células en diferentes grados y potencialmente inhibir a la PP1 y PP2A de una manera diferencial. De tal manera que estos inhibidores resultan ser muy útiles en la identificación de procesos biológicos que son regulados por la fosforilación reversible de proteínas (Cicirelli, 1992) (ver TABLA III).

TABLA III. PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES DE PROTEINAS FOSFATASAS.

<u>PROPIEDAD</u>	<u>ACIDO OKADAICO</u>	<u>MICROCISTINA</u>	<u>CALICULINA</u>	<u>TAUTOMICINA</u>
Peso molecular (Da)	805	994	1009	767
Descripción	ácido graso poliéter	heptapéptido hepatotóxina	N.D.	N.D.
Toxicidad	tóxico	tóxico	tóxico	tóxico
Penetración en células	si	no excepción	si	si excepción
Inhibición de la PP1 (IC50) (Ki)	10-60 nM 10-20 nM	0.1 nM 0.06 nM	0.5-2 nM N.D.	0.2-22 nM 0.16 nM
Inhibición de la PP2A (IC50) (Ki)	0.1-1 nM 0.03-0.2 nM	0.1 nM <0.01 nM	0.1-1 nM N.D.	1-32 nM 0.4 nM
Inhibición de la PP2B (IC50)	5-10 µM	0.2 µM	N.D.	80 µM
Inhibición de la PP2C (IC50)	>10 µM	>4 µM	N.D.	>100 µM

N.D.= no determinado.

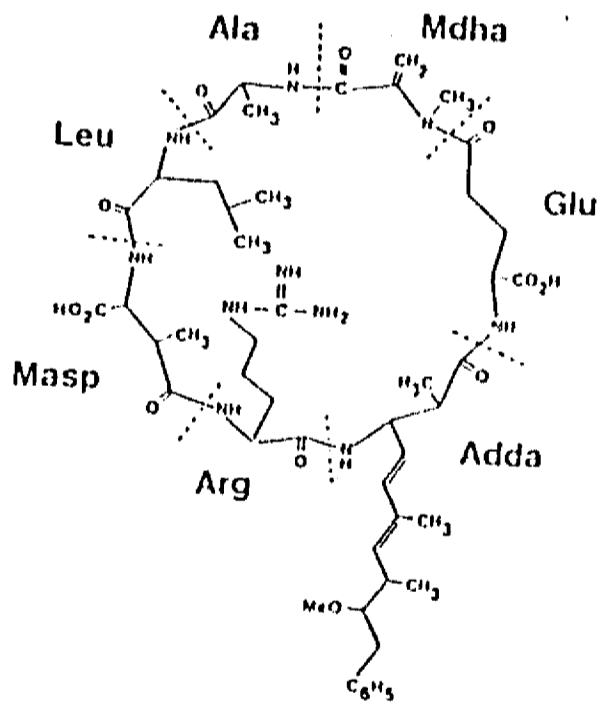
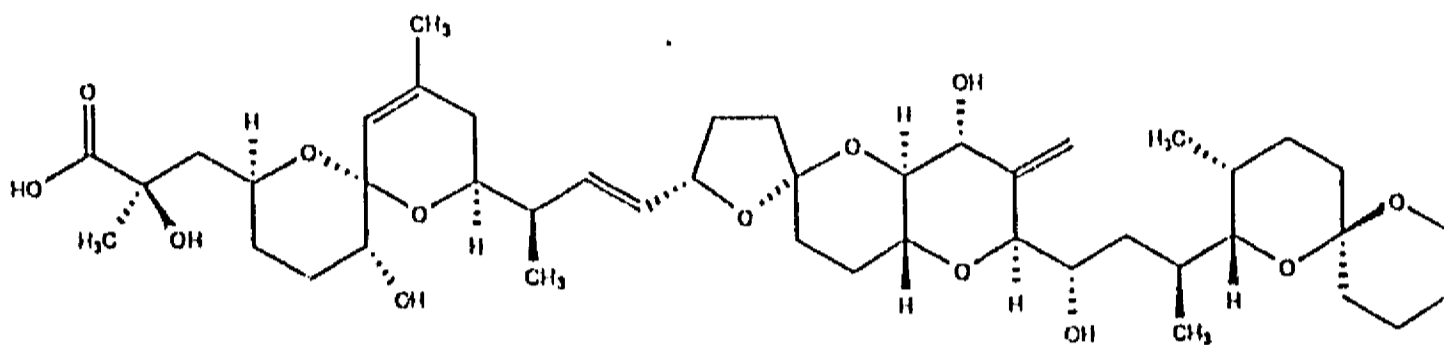
EL ACIDO OKADAICO.

El ácido okadaico es un derivado poliéter de un ácido graso de 38 carbonos (ver ESQUEMA V). Es sintetizado por varios tipos de dinoflagelados marinos, especialmente del género Dinophysis, que se acumulan en algunos organismos filtradores como la esponja negra Halicondria okadaei, de la cual fué inicialmente aislado por Tachibana y col. en 1981. Esta toxina marina se sabe que pertenece a una familia de toxinas relacionadas en las cuales se incluye a la dinofisistoxina 1 y a la acantifolicina. Se caracteriza por ser un promotor de tumores muy potente y se considera responsable de la diarrea causada por envenenamiento con mariscos ("diarrhetic shellfish poisoning (DSP)") (Cohen y col., 1990; Hardie y col., 1991).

Takai y colaboradores en 1987, sugieren por primera vez que el ácido okadaico es un inhibidor de las proteínas fosfatasas 1 y 2A. Posteriormente se confirma esta idea y se observa que la PP2A es completamente inhibida por 1 nM de ácido okadaico, mientras que la PP1 no es afectada a esta concentración, ya que su IC50 es de 10-15 nM. Esta sensibilidad es notablemente conservada en las células eucarióticas (Cohen y col. 1990). Por otro lado, los estudios cinéticos han mostrado que el ácido okadaico actúa como un inhibidor no competitivo o mixto de las PP1 y PP2A, sugiriendo que el sitio de unión para esta droga esta fuera del sitio catalítico (Bialojan y Takai, 1988).

El ácido okadaico no parece tener efecto directo sobre otras fosfatasas de proteínas o sobre las cinasas de proteínas (Haystead y col., 1989). Sin embargo puede ejercer al menos dos tipos de

ACIDO OKADAICO



MICROCISTINA-LR

ESQUEMA V. Dos potentes inhibidores de las proteínas fosfatasas 1 y 2A: el ácido okadaico y la microcistina.

efectos indirectos sobre las cinasas de proteínas y sus sustratos. Primero las cinasas de proteínas cuya actividad es regulada por fosforilación reversible pueden ser estimuladas en la ausencia de actividad de fosfatasas. Segundo, algunos de los sustratos de las cinasas pueden acumularse en un estado de fosforilación sostenida cuando las fosfatasas están bloqueadas. Así, sucede que el bloqueo de las PP1 y PP2A por el ácido okadaico desvía el balance de fosforilación de proteínas hacia un incremento en la fosforilación (Schönthal, 1992).

El ácido okadaico ha sido empleado en diversos estudios. El uso de este agente en extractos libres de células ha llevado a la identificación de varias proteínas cuyas actividades son controladas por fosforilación. Su uso en células intactas ha sido extremadamente útil en la identificación de sustratos fisiológicos de las PP1 y PP2A. En la tabla IV se presentan algunas de las acciones del ácido okadaico en diferentes células.

TABLA IV. ALGUNOS DE LOS EFECTOS DEL ACIDO OKADAICO SOBRE CELULAS INTACTAS (Tomada de Hardie y col., 1991).

<u>SISTEMA EXPERIMENTAL</u>	<u>EFECTO DEL ACIDO OKADAICO</u>
Músculo liso de conejo y humano	Inicia contracción
Piel de ratón	Promueve la inducción de tumores
Hepatocitos de rata	Estimula la salida de glucosa Estimula la gluconeogénesis
Adipocitos de rata	Inhibe la síntesis de ácidos grasos. Estimula la lipólisis. Mimetiza los efectos de insulina sobre la captura de desoxi-glucosa.
Macrófagos peritoneales de rata	Incrementa la producción de PGE ₂ .
Neuronas de molusco (<u>Helix aspersa</u>)	Potencia la supresión de la corriente de K ⁺ inducida por 5HT
Protozoario <u>Paramecium tetraurelia</u>	Prolonga el nado hacia atrás debido a un retraso en los canales de Ca ⁺⁺ .
Miocitos cardiacos	Incrementa la corriente de calcio tipo L.
Miocitos traqueales	Incrementa la probabilidad del estado abierto de los canales de K ⁺ dependientes de Ca ⁺⁺ .
Células NIH 3T3	Causa reversión del fenotipo transformado inducido por los oncogenes raf-1 y ret-2.

Los estudios que se han realizado en hepatocitos con el ácido okadaico han mostrado que este agente induce un incremento en el estado de fosforilación de muchas proteínas. Entre estas proteínas se encuentran enzimas clave de vías metabólicas como la glucólisis y la gluconeogénesis (Cohen, 1990). Entre otras de sus acciones se encuentran: la fosforilación de la proteína Gi, lo cual lleva a un bloqueo de la inhibición de la adenilato ciclasa (Bushfield, 1991); y la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina, probablemente debido a un aumento en el estado de fosforilación de la citidiltransferasa (Hatch y col. 1992).

Con base en diversos estudios, actualmente es claro que las acciones de las hormonas pueden ser reguladas por la fosforilación de proteínas a muy diversos niveles, ya sea a nivel de sus receptores o a nivel de alguno de los componentes del sistema de transducción al cual dichos receptores se encuentran acoplados, de tal manera que las acciones de las hormonas pueden resultar favorecidas o inhibidas; y debido a que el ácido okadaico resulta ser una herramienta útil en la identificación de procesos biológicos que son controlados por fosforilación reversible de proteínas, decidimos utilizarlo para estudiar el papel que juegan las proteínas fosfatasas en la regulación de sistemas de transducción de hormonas que modulan el metabolismo de fosfoinosítidos. Los resultados de este estudio se presentan en los siguientes trabajos:

TRABAJO 2.

- García-Sáinz, J.A., M. Macías-Silva and M.T. Romero-Avila. (1991) Effect of okadaic acid on hormone- and mastoparan-stimulated phosphoinositide turnover in isolated rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179(2):852-858.

TRABAJO 3.

- Macías-Silva, M. and J.A. García-Sáinz. (1993) Inhibition of hormone-stimulated phosphoinositide turnover and disruption of cytoskeletal structure. Effects of okadaic acid, microcystin, chlorpromazine, W7 and nystatin. TOXICON. (en prensa).

RESUMEN DE RESULTADOS.

TRABAJO 2:

En hepatocitos aislados de rata pudimos observar que :

- 1) El ácido okadaico inhibe parcialmente el marcaje de fosfatidilinositol (PI) estimulado por angiotensina II, epinefrina o vasopresina.
- 2) La producción de fosfatos de inositol estimulada por angiotensina II, epinefrina o vasopresina, es también inhibida por el ácido okadaico.
- 3) Mastoparan, una toxina aislada del veneno de avispa, estimula la producción de fosfatos de inositol. Estas acciones también son inhibidas por el ácido okadaico.

EFFECT OF OKADAIC ACID ON HORMONE- AND MASTOPARAN-STIMULATED PHOSPHOINOSITIDE
TURNOVER IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES

J. Adolfo García-Sáinz, Marina Macías-Silva and M. Teresa Romero-Avila

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

Received July 22, 1991

Okadaic acid is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A which seems to be useful for identifying biological processes that are controlled by reversible phosphorylation of proteins. We report here that okadaic acid inhibits in isolated hepatocytes the stimulations of phosphoinositide turnover induced by epinephrine, angiotensin II and vasopressin. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom that mimics receptors by activating G-proteins, also stimulates the accumulation of inositol phosphates in hepatocytes. Interestingly, this action of mastoparan was also inhibited by okadaic acid. Our data indicate that okadaic acid inhibits the phosphoinositide turnover signal transduction system in hepatocytes at a level distal to the receptors. © 1991 Academic Press, Inc.

Okadaic acid, a polyether fatty acid produced by several types of dinoflagellates, is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A [1,2]. This compound is a new probe for the study of cellular regulation since it seems to be useful for identifying biological processes that are controlled by reversible phosphorylation of proteins [3,4].

Protein phosphorylation is one of the most common biochemical mechanisms through which cells regulate their metabolism [5]. The function of some of the molecular entities involved in signal transduction seems to be modulated by phosphorylation/dephosphorylation cycles, i.e., there is a large amount of evidence of receptor phosphorylation [see 6] and also some evidence of regulation by phosphorylation of G-proteins [7-9] and membrane effectors, such as adenylate cyclase [10] and phospholipase C [11,12].

Using isolated rat hepatocytes, we first showed that activation of protein kinase C blocks the α_1 -adrenergic action in hepatocytes [13,14]. The effect

was rather selective since the effects of other receptors coupled to the same signal transduction system (phosphoinositide turnover) were either not affected or affected to a much lesser extent [13,14]. Using smooth muscle cells it was shown that the blockade of the α_1 -adrenergic action induced by protein kinase C activation is associated to α_1 -adrenoceptor phosphorylation [18].

Here, we report the effect of okadaic acid on the phosphoinositide turnover signal transduction system in isolated rat hepatocytes. Our results indicate that this agent alters the function of the system at a postreceptor site.

MATERIALS AND METHODS

1-Epinephrine, angiotensin II, vasopressin and mastoparan were obtained from Sigma Chemical Co. 2- $[^3H]$ -Myo inositol (20 Ci/mmol) and $[^{32}P]PI$ (carrier free) were obtained from New England Nuclear. The anion exchange resin AG 1-X8 (formate form) was from BioRad and collagenase from Worthington. Okadaic acid was from Gibco (the initial experiments were performed with a sample of this tumor promoter generously provided by Dr. Philip Cohen, (Dundee, U.K.)).

Experiments were performed with female Wistar rats (220-250 g) fed ad libitum. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend [19]. The cells (30-40 mg wet weight) 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.

Phosphatidylinositol labeling was studied as described previously [20]. Production of inositol phosphates was studied as described [21,22]. In brief, the cells were incubated for 90 min with 15 μ Ci/ml of tritiated inositol, washed and incubated for 10 min with 10 mM LiCl in the presence or absence of okadaic acid; the hormones were added and after 5 min of incubation the reaction was stopped. Inositol phosphates were separated by anion exchange chromatography as described by Herridge et al [23]. The total counts in fractions 1-4 (IP₁), 6-8 (IP₂) and 11-12 (IP₃) were added to determine the production of these inositol phosphates.

RESULTS

In cells incubated with $[^{32}P]PI$, epinephrine induced a dose-dependent increase in the labeling of phosphatidylinositol (PI) (Fig. 1, left panel). Okadaic acid by itself decreases the basal labeling of phosphatidylinositol (33 \pm 3% decrease in basal labeling at 1 μ M okadaic acid; n=7, p < 0.005 vs basal labeling). To study the effect of hormones in cells incubated with this tumor promoter, we took into account this decrease in labeling and expressed the data as percentage of their own basal, i.e. the labeling observed in cells run in parallel with the same concentration of okadaic acid. Under these conditions,

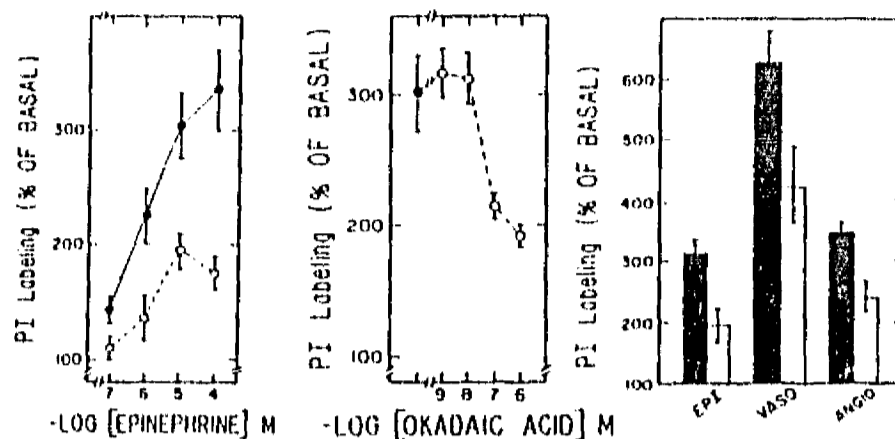


Figure 1. EFFECT OF OKADAIC ACID ON HORMONAL STIMULATION OF PHOSPHATIDYL INOSITOL (PI) LABELING. Left Panel: cells were incubated in the absence (●—●) or presence (○---○) of 1 μ M Okadaic Acid and with different concentrations of epinephrine plus 10 μ M propranolol. Middle panel: cells were incubated with 10 μ M epinephrine plus 10 μ M propranolol alone (○) or with (●) different concentrations of okadaic acid. Right panel: cells were incubated without (solid bars) or with (open bars) 1 μ M Okadaic Acid and the agonists: EPI, 10 μ M epinephrine plus 10 μ M propranolol; VASO, 10 nM vasopressin; ANGIO, 10 μ M angiotensin II. Results are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4-5 experiments in duplicate.

we observed that okadaic acid produced a dose-dependent partial inhibition of the α_1 -adrenergic effect of epinephrine ($IC_{50} \approx 50$ nM okadaic acid) (Fig. 1 middle panel); the polyether fatty acid altered the maximal effect of the adrenergic agonist without affecting its EC_{50} (≈ 3 μ M epinephrine) (Fig. 1, left panel). The inhibitory action of okadaic acid was not selective for the α_1 -adrenergic effect, i. e. the action of other hormones that also stimulate PI labeling, such as vasopressin or angiotensin II, was also inhibited and to a similar extent (40-60 %) (Fig. 1, right panel).

We confirmed this observation by quantifying the production of inositol phosphates. Okadaic acid was without effect by itself on the basal production of inositol phosphates. In contrast, it markedly attenuated the stimulations induced by epinephrine, vasopressin and angiotensin II (Fig. 2 and Table 1). Interestingly, not only the effect of these hormones was altered but the stimulation of IP_2 and IP_3 production induced by mastoparan was also inhibited by okadaic acid (Fig. 3 and Table 2).

DISCUSSION

Our present results indicate that okadaic acid markedly alters the phosphoinositide turnover signal transduction system in hepatocytes. Two

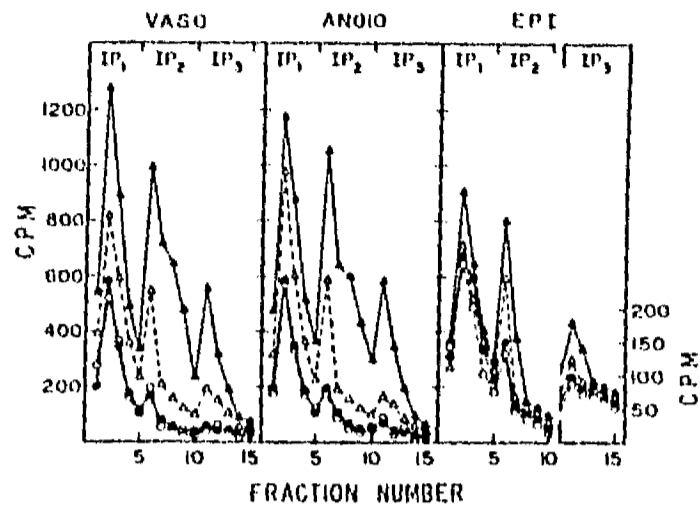


Figure 2. ELUTION PROFILE OF INOSITOL PHOSPHATES. Cells were incubated in the absence of any agent (●—●) with 1 μ M Okadaic Acid (○—○) with the agonists (VASO, 10 nM vasopressin; ANGIO, 10 μ M angiotensin II or EPI, 10 μ M epinephrine plus 10 μ M propranolol) (▲—▲) or with the agonists plus 1 μ M okadaic acid (△—△). Note left ordinate for EPI-IP₃. Data are from a representative experiment in triplicate.

TABLE 1
EFFECTS OF OKADAIC ACID, EPINEPHRINE, VASOPRESSIN AND ANGIOTENSIN II ON
[³H]INOSITOL PHOSPHATES ACCUMULATION

Condition	Inositol Phosphates (cpm/40 mg cells w.w.)		
	IP ₁	IP ₂	IP ₃
Basal	2300 ± 160	400 ± 40	125 ± 5
Okadaic Acid 1 μ M	2320 ± 210	385 ± 35	135 ± 10
Epinephrine 10 μ M	2690 ± 175	740 ± 90 ^a	210 ± 20 ^b
Epinephrine 10 μ M + Okadaic Acid 1 μ M	2340 ± 215	510 ± 60 ^c	150 ± 10 ^d
Angiotensin II 10 μ M	3085 ± 125 ^a	1650 ± 230 ^b	610 ± 95 ^b
Angiotensin II 10 μ M + Okadaic Acid 1 μ M	2590 ± 170 ^c	990 ± 135 ^c	320 ± 45 ^d
Vasopressin 10 nM	3065 ± 130 ^a	1635 ± 160 ^b	660 ± 85 ^b
Vasopressin 10 nM + Okadaic Acid 1 μ M	2345 ± 155 ^e	740 ± 60 ^f	325 ± 50 ^e

Results are the means ± S.E.M. of 8 experiments in triplicate.

^ap < 0.005 vs basal; ^bp < 0.001 vs basal; ^cp < 0.05 vs hormone alone; ^dp < 0.02 vs hormone alone; ^ep < 0.005 vs hormone alone; ^fp < 0.001 vs hormone alone.

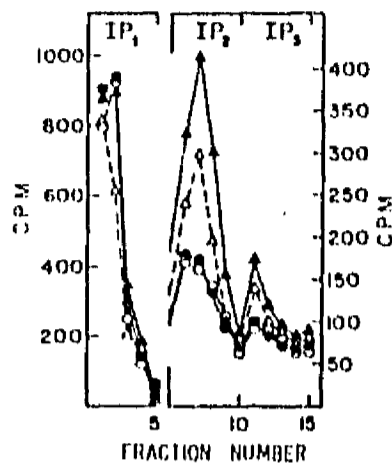


Figure 3. ELUTION PROFILE OF INOSITOL PHOSPHATES. Cells were incubated in the absence of any agent (●—●) with 1 μ M Okadaic Acid (○—○) with 50 μ M mastoparan (▲—▲) or with 50 μ M mastoparan plus 1 μ M Okadaic acid (△—△). Note left ordinate for IP₂ and IP₃. Data are from a representative experiment in triplicate.

different, but complementary parameters were determined to document this finding. i.e., hydrolysis (production of inositol phosphates) and resynthesis (PI labeling) of phosphoinositides. The results of both parameters were entirely consistent and indicate that this inhibitor of protein phosphatases partially inhibits this signal transduction process.

The effect of okadaic acid was different to that of phorbol myristate acetate (PMA). Using hepatocytes, it has been observed that activation of

TABLE 2
EFFECTS OF OKADAIC ACID AND MASTOPARAN ON [³H]IP₃ ACCUMULATION

Condition	Inositol Phosphates (cpm / 40 mg cells w.w.)	
	IP ₂	IP ₃
Basal	315 ± 20	125 ± 5
Okadaic Acid 1 μ M	350 ± 30	130 ± 10
Mastoparan 50 μ M	555 ± 25 ^a	175 ± 10 ^a
Mastoparan 50 μ M + Okadaic Acid 1 μ M	440 ± 25 ^b	155 ± 10

Results are the means ± S.E.M. of 7 experiments in triplicate.

^a p < 0.001 vs basal; ^b p < 0.01 vs mastoparan alone.

protein kinase C by PMA leads to a complete blockade of the α_1 -adrenergic action [13-17] with only minor effects on that of other hormones [13-17]. In contrast, the inhibition induced by okadaic acid was rather broad and no receptor selectivity was observed. These data suggest that the action(s) of okadaic acid is (are) not exerted at the level of the hormone receptors but on entities involved in steps subsequent to receptor activation, possibly the G-protein or phospholipase C. The data with mastoparan are consistent with this interpretation.

Mastoparan is a tetradecapeptide toxin from wasp venom that is a potent stimulator of secretion in several cells [24-26]. Mastoparan seems to act on G-proteins promoting nucleotide exchange by a mechanism strikingly similar to that used by receptors [27]. Tolkin et al [28] observed, that high concentrations, of mastoparan increase cytosolic free calcium and IP_3 accumulation. We confirmed this later finding and observed that 50 μM mastoparan increases modestly but consistently the production of IP_2 and IP_3 . Okadaic acid inhibited this effect. These data further suggest that the perturbation of the phosphoinositide turnover transduction system induced by okadaic acid does not take place at the level of the receptors but rather at the level of the G-protein, on which mastoparan putatively acts, or on phospholipase C. Activation of protein kinase C in a variety of cells and tissues results in the inhibition of receptor-mediated stimulation of phosphoinositide turnover [12, 29, 30]. There is evidence of phosphorylation of phospholipase C- β by protein kinase C [12] and it has been suggested that phosphorylation of phospholipase C may alter its interaction with the G-protein [12]. It should be mentioned, however, that with the whole-cell approach used in this study we can not rule out changes in the activity of enzymes controlling the steady state levels of inositol phospholipids and inositol phosphates. Experiments are in progress, using cell-free systems, to define the site(s) where the alteration(s) induced by okadaic acid take place. In summary, our data indicate that okadaic acid alters the phosphoinositide turnover transduction system in hepatocytes at a level distal to the receptors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Phillip Cohen for his generous gift of okadaic acid. They also thank Ms. Guadalupe Ramirez for typing the manuscript. This research was partially supported by a Grant from DGAPA (IN 201889).

REFERENCES

1. Bialojan, C., and Takai, A. (1988) *Biochem. J.* 256, 283-290.
2. Heschler, J., Mieskes, G., Ruegg, J.C., Takai, A. and Trautwein, W. (1988) *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* 412, 248-252.
3. Haystead, T.A.J., Sim, A.T.R., Carling, D., Bonnor, R.C, Tsukitani, Y., Cohen, P. and Hardie, D.G. (1989) *Nature* 337, 78-81.
4. Cohen, P., Holmes, C.F.B. and Tsukitani, Y. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 98-102.
5. Cohen, P. (1982) *Nature* 296, 613-620
6. Moudgil, V.K. (1989) *Receptor Phosphorylation*. CRC Press, Inc. U.S.A.
7. Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S. and Jakobs, K.H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 431-437.
8. Houslay, M.D. (1991) *Cell. Signal.* 3, 1-9.
9. Bushfield, M., Lavan, B.E. and Houslay, M.D. (1991) *Biochem. J.* 274, 317-321.
10. Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1987) *Nature* 327, 67-70.
11. Nishibe, S., Wahl, M.I., Hernández-Sotomayor, S.M.T., Tonks, N.K., Rhee, S.G., Carpenter, G. (1990) *Science* 250, 1253-1256.
12. Ryu, S.H., Kim, U-H., Wahl, M.I., Brown, A.B., Carpenter, G., Huang, K-P., and Rhee, S.G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 17941-17945.
13. Corvera, S. and Garcia-Sáinz, J.A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128-1133.
14. Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M. and Garcia-Sáinz, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 520-526.
15. Lynch, C.J., Charest, R., Bocchino, S.B., Exton, J.H. and Blackmore, P.F. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2844-2851.
16. Cooper, R.H., Coll, K.E. and Williamson, J.R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3281-3288.
17. Van de Werve, G., Proietto, J. and Jeanrenaud, B. (1985) *Biochem. J.* 231, 511-516.
18. Leeb-Lundberg, L.M.F., Cotecchia, S., Lomasney, J.W., DeBernardis, J.F., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5651-5655.
19. Berry, M.N. and Friend, D.S. (1969) *The Journal of Cell Biology* 43, 506-520.
20. Garcia-Sáinz, J.A. (1987) *Circ. Res.* 61 (Suppl. II) 1-5.
21. Charest, R., Prpic, V., Exton, J.H. and Blackmore, P.F. (1985) *Biochem. J.* 227, 79-90.
22. Garcia-Sáinz, J.A. and Macías-Silva, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 780-785.
23. Berridge, M.J., Dawson, R.M., Downes, P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1983) *Biochem. J.* 212, 473-482.
24. Hirai, Y., Yasuhara, T., Yoshida, H., Nakajima, T., Fujino, M., and Kitada, C. (1979) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 27, 1942-1944.
25. Kuroda, Y., Yoshioka, M., Kumajura, K., Kobayashi, K. and Nakajima, T. (1980) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 56, 660-664.
26. Kurihara, H., Kitajima, K., Senda, T., Fujita, H. and Nakajima, T. (1986) *Cell. Tissue Res.* 243, 311-316.
27. Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., and Ross, E.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6491-6494.
28. Tohkin, M., Yagami, T., and Matsubara, T. (1990) *FERS Lett* 260, 179-182.
29. Blackmore, P.F., and Exton, J.H. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 11056-11063.
30. Orellana, S., Solski, P.A., and Brown, J.H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1638-1643.

TRABAJO 3:

- 1) El ácido okadaico y la microcistina, dos potentes inhibidores de proteínas fosfatasas, inhiben la producción de fosfatos de inositol estimulada por vasopresina, de una manera dependiente de la dosis.
- 2) El ácido okadaico y la microcistina, así como otros agentes tales como el W7 y la clorpromazina (antagonistas de calmodulina) y el antibiótico nistatina, son capaces de inducir alteraciones morfológicas, "ampollas" (denominadas "blebs"), en los hepatocitos de rata.
- 3) Varias drogas perturbadoras del citoesqueleto como son la clorpromazina, el W7 y la nistatina, también inhiben de una manera dependiente de la dosis la producción de fosfatos de inositol estimulada por vasopresina.
- 4) La producción de inositol trisfosfato estimulada por angiotensina II, epinefrina o vasopresina es inhibida por varios agentes perturbadores del citoesqueleto tales como: ácido okadaico, microcistina, clorpromazina, W7 y nistatina.
- 5) Es importante señalar que estos agentes perturbadores del citoesqueleto no disminuyen la viabilidad de las células. Esto fue evaluado observando la exclusión del azul de tripano.

INHIBITION OF HORMONE-STIMULATED
INOSITOL PHOSPHATE PRODUCTION AND
DISRUPTION OF CYTOSKELETAL STRUCTURE.
EFFECTS OF OKADAIC ACID, MICROCYSTIN,
CHLORPROMAZINE, W7 AND NYSTATIN,

MARINA MACÍAS-SILVA and J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ

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

14 May 1993; accepted 12 August 1993

M. MACÍAS-SILVA and J. A. GARCÍA-SÁINZ. Inhibition of hormone-stimulated inositol phosphate production and disruption of cytoskeletal structure. Effects of okadaic acid, microcystin, chlorpromazine, W7 and nystatin. *Toxin* 32, 000–000, 1994.—Inhibition of protein phosphatases 2A and 1 by okadaic acid and microcystin leads to cytoskeletal disruption and formation of plasma membrane blebs (blebbing) in hepatocytes. This phenomenon is associated to a marked inhibition of receptor-mediated and G-protein-mediated phosphoinositide turnover in rat hepatocytes. Other cytoskeletal-disrupting drugs such as chlorpromazine, W7 and nystatin mimic the effect of these protein phosphatase inhibitors on phosphoinositide metabolism and blebbing. Our data suggest that the coupling between G-protein and phospholipase C might be altered by cytoskeletal disruption.

INTRODUCTION

DURING the last few years a great amount of research has been published on the roles that the cytoskeletons play in modulating signal transduction (WANG *et al.*, 1990; WANG, 1991; WANG and RASENICK, 1991). Recently, a link between cytoskeletal elements and the phosphoinositide turnover signal transduction pathway was discovered. It has been observed that some actin-binding proteins, such as profilin and gelsolin, bind to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inhibit its hydrolysis by phospholipase C (LASSING and LINDBERG, 1985; JANMEY and STOSSEL, 1989; GOLDSCHMIDT-CLERMONT *et al.*, 1990, 1991). Furthermore, it has been observed that some components of this signal transduction pathway (such as phospholipase C, inositol lipids, phosphoinositide kinases and diacylglycerol kinases) interact with the cytoskeleton (NAKANO *et al.*, 1989; GRONDIN *et al.*, 1991; McBRIDE *et al.*, 1991; PAYRASTRE *et al.*, 1991).

Agents such as inhibitors of microtubule polymerization (colchicine and vinblastines), metals (mercury), hepatotoxins (carbon tetrachloride) and quinones inhibit agonist-stimulated phosphoinositide metabolism (NICOTERA *et al.*, 1992). One of the main common actions of these drugs is the perturbation of normal cytoskeletal organization, inducing

the formation of blebs on the plasma membrane (NICOTERA *et al.*, 1992). The formation of blebs has been associated with disturbances in thiol metabolism, intracellular calcium concentration, ATP depletion and rearrangement of cytoskeletal proteins (JEWELL *et al.*, 1982; ORRENTUS *et al.*, 1992).

Cytoskeletal integrity in cells appears to require protein phosphatase activity (ERIKSSON *et al.*, 1992). Inhibitors of protein-serine/threonine phosphatases 2A and 1, such as okadaic acid and microcystin, produce profound morphological alterations in a variety of cells. The changes include reorganization of the microfilament and intermediate-filament networks, organelle segregation and surface blebbing (RUNNEGAR and FALCONER, 1986; ERIKSSON *et al.*, 1987; BOE *et al.*, 1991; ERIKSSON *et al.*, 1990). We and others have previously reported that okadaic acid markedly alters the phosphoinositide turnover signal transduction system in hepatocytes (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1991; MATTINGLY and GARRISON, 1992). In this study, we evaluate the effects of microcystin, another phosphatase inhibitor, chlorpromazine and W7, calmodulin antagonists, and the antibiotic, nystatin, on both parameters, i.e. agonist-activated phosphoinositide turnover and blebbing, in rat hepatocytes. Our results suggest a close relationship between both parameters.

MATERIALS AND METHODS

Vasopressin, angiotensin II, chlorpromazine, W7 [*N*-6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide] and l-epinephrine were obtained from Sigma Chemical Co. 2-[³H]-Myo-inositol (20 Ci/mmol) was purchased to New England Nuclear. The anion exchange resin AG 1-X3 (formate form) was from BioRad and collagenase from Worthington. Okadaic acid was from RBI and microcystin from Gibco.

Hepatocytes were isolated from female Wistar rats (200–250 g) fed *ad libitum* by the method of BERRY and FRIEND (1969). The cells (30–40 mg wet weight) 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.

Inositol phosphate production was studied as described (GARCÍA-SÁINZ and MACÍAS-SILVA, 1990). In brief, the cells were incubated for 90 min with 15 μ Ci/ml of tritiated inositol, washed and incubated for 10 min with 10 mM LiCl in the presence or absence of the following drugs: okadaic acid, microcystin, W7, chlorpromazine or nystatin. After this, hormones were added to the cell suspension and the incubation was continued for 5 min. Inositol phosphates were separated by anion exchange chromatography as described by BERRIDGE *et al.* (1983). Intracellular calcium was assessed by fluorometric measurement of the calcium-quin 2 complex (STADDON and HANSFORD, 1991; GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1990).

RESULTS AND DISCUSSION

It was previously reported that okadaic acid markedly attenuated hormone-stimulated phosphoinositide turnover in rat hepatocytes (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1991; MATTINGLY and GARRISON, 1992). Not only was the effect of hormones diminished, but the stimulation of this parameter induced by mastoparan was also inhibited by okadaic acid. The data suggested a postreceptor site of action of the treatment with the phosphatase inhibitor. We tested whether another phosphatase inhibitor, microcystin, a cyclic heptapeptide toxin isolated from cyanobacteria, was able to mimic the effects of okadaic acid on phosphoinositide turnover. Most cells are impermeable to microcystin, but hepatocytes accumulate this toxin via a selective uptake mechanism for the liver, namely the multispecific transport system for bile acids (ERIKSSON *et al.*, 1987). As shown in Fig. 1, okadaic acid (IC₅₀ \approx 40–60 nM) and microcystin (IC₅₀ \approx 50–60 nM) dose-dependently inhibited the production of inositol bisphosphate and trisphosphate induced by 10 nM vasopressin. These data indicate that two, chemically unrelated, protein phosphatase inhibitors have the same action. It is important to point out that the effects of these inhibitors on phosphoinositide metabolism were accompanied by blebbing (Fig. 2).

In order to study the role of the cytoskeletal integrity on phosphoinositide turnover in hepatocytes, the effects of several cytoskeletal disrupting drugs such as W7 (calmodulin antagonist) and chlorpromazine (antipsychotic, calmodulin antagonist) on vasopressin-stimulated inositol phosphates production were investigated. The ability of these drugs to induce blebs at the concentrations employed was confirmed (Fig. 2). The effect of nystatin, which also induced blebbing, was also studied (Fig. 2).

W7 ($IC_{50} \approx 100-125 \mu M$), chlorpromazine ($IC_{50} \approx 50-100 \mu M$) and nystatin ($IC_{50} \approx 0.6-0.7 \mu g/ml$) markedly inhibited the effect of vasopressin in a dose-dependent manner (Fig. 3). The inhibitory action of these agents was not selective for the vasopressin effect, i.e. the action of other hormones that also stimulate phosphoinositide turnover, such as angiotensin II or epinephrine, was also inhibited. In Fig. 4, the stimulation of inositol trisphosphate production by vasopressin, angiotensin II and epinephrine (right panel) and their inhibition by $1 \mu M$ okadaic acid, $1 \mu M$ microcystin, $100 \mu M$ chlorpromazine, $100 \mu M$ W7 or $50 \mu g/ml$ nystatin (left panel) are shown.

It is not known through which mechanism(s) these drugs exert such actions. However, it has been reported that calmodulin antagonist at high doses produces microfilament disintegration (Iwig *et al.*, 1991), and it has been reported that phospholipase C (activity is inhibited by W7 and cytochalasin D (another microfilament-disrupting drug)) (Bourguignon *et al.*, 1990).

It was previously shown that this inhibitory effect of okadaic acid shows no receptor selectivity and therefore it was suggested that such action is exerted at step(s) subsequent

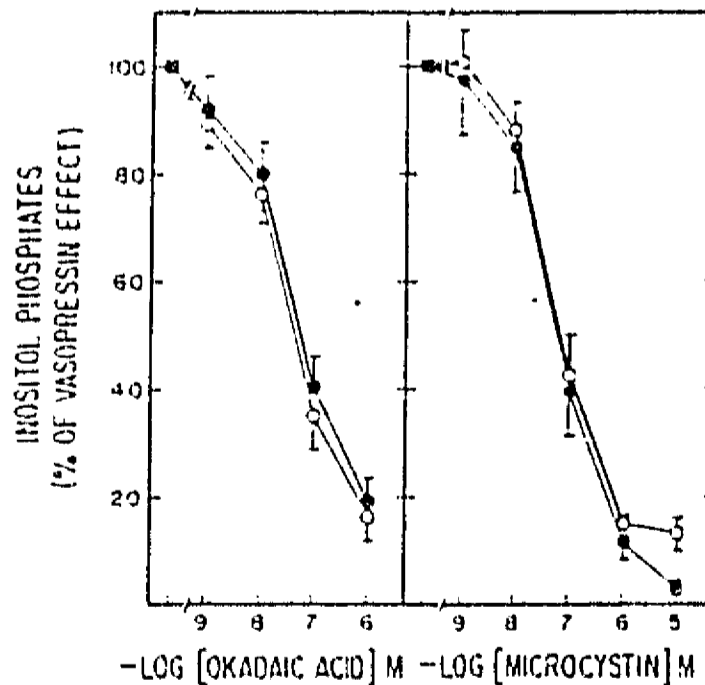


FIG. 1. EFFECT OF PHOSPHATASE INHIBITORS ON VASOPRESSIN-INDUCED INOSITOL PHOSPHATES PRODUCTION.

Hepatocytes were preincubated with okadaic acid or microcystin for 10 min and incubated for further 5 min with 10 nM vasopressin. (○) Inositol bisphosphate; (●) inositol trisphosphate; (■) vasopressin alone. Inositol bisphosphate: basal $337 \pm 41 \text{ cpm}/40 \text{ mg cells wet weight}$; vasopressin (10 nM), $2262 \pm 388 \text{ cpm}/40 \text{ mg cells wet weight}$. Inositol trisphosphate: basal, $253 \pm 23 \text{ cpm}/40 \text{ mg cells wet weight}$. Vasopressin (10 nM) $987 \pm 156 \text{ cpm}/40 \text{ mg cells wet weight}$. Plotted are the means \pm S.E.M. of three experiments, each performed in triplicate using different cell preparations.



FIG. 2. MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN ISOLATED HEPATOCYTES INCUBATED WITHOUT (CONTROL CELLS) OR WITH 1 μ M OKADAIC ACID, 1 μ M MICROCYSTIN, 100 μ M W7, 100 μ M CHLORPROMAZINE OR 50 μ g/ml NYSTATIN FOR 10 min AT 37°C. Representative of five different experiments with identical results.

to receptor activation; i.e. possibly at level of G-protein or phospholipase C (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1991). This was further supported by the finding that the activation of inositol phosphate production induced by mastoparan (a toxin from wasp venom, which activates G-proteins; MOUSLY *et al.*, 1990) was also inhibited by okadaic acid (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1991). Consistent with this, it was now observed that 5 mM NaF plus

10 μ M AlCl₃ (cells incubated in buffer containing 125 μ M CaCl₂) stimulated inositol phosphates production (inositol bisphosphate 147 \pm 14% of basal, inositol trisphosphate 129 \pm 15% of basal) and that this effect was essentially abolished by 1 μ M okadaic acid. Recently, TASAKA *et al.* (1991) reported that colchicine and vinblastine inhibit in mast cells the increases in intracellular calcium concentration caused by compound 48/80 (another agent that putatively directly activates G-proteins (MOUSLY *et al.*, 1990)). Since mastoparan, AIF4- and compound 48/80 activate phosphoinositide metabolism putatively at level of G-proteins, we would like to suggest the possibility that the interaction between G-protein and phospholipase C may be altered by disrupting the cytoskeletal structure.

Inhibition of protein phosphatases alters cytoskeletal structure; however, other cytoskeletal disturbing agents that do not inhibit this enzyme activity mimic the effect of okadaic acid and microcystin on phosphoinositide metabolism. These data suggest the possibility that inhibition of protein phosphatase activity could be just one of several possible mechanisms of disrupting cytoskeletal structure, and this is consistent with the idea that such alteration may perturbate G-protein-phospholipase C coupling.

The molecular basis of plasma membrane blebbing is presently unknown. However, several mechanisms have been implicated in this action. Some agents, such as colchicine or cytochalasins, interact directly with cytoskeletal elements, whereas others, such as some quinones, increase intracellular calcium concentration (NICOTERA *et al.*, 1986, 1992).

Regarding intracellular calcium concentration, it is well known that this cation plays a critical role in modulating cytoskeletal structure and function, and that it regulates the activity of phospholipase A₂, which stimulates eicosanoid synthesis. Thromboxanes have been implicated as intermediates in cell injury (HURTON and WOOD, 1991). Moreover, it

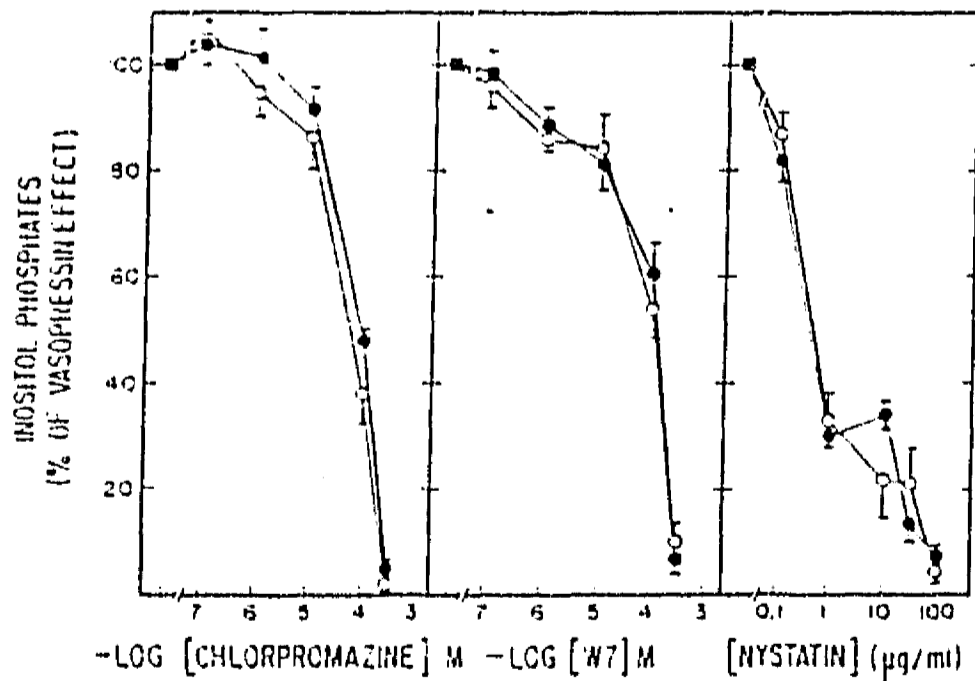


FIG. 3. EFFECT OF SEVERAL CYTOSKELETAL-DISRUPTING DRUGS ON INOSITOL PHOSPHATES PRODUCTION INDUCED BY VASOPRESSIN.

Cells were preincubated with chlorpromazine, W7 or nystatin for 10 min and incubated for further 5 min with 10 nM vasopressin. (○) Inositol bisphosphate; (●) inositol trisphosphate; (■) vasopressin alone. Other indications as in Fig. 1.

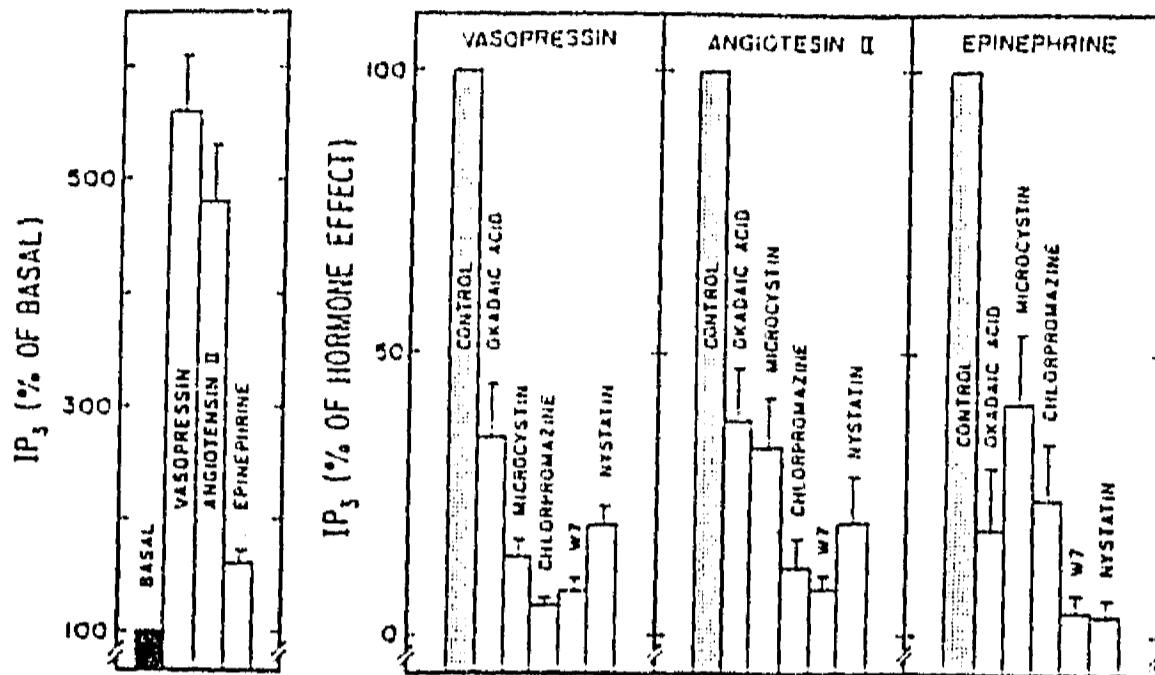


FIG. 4. HORMONE-STIMULATED INOSITOL TRISPHOSPHATE (IP₃) PRODUCTION AND EFFECT OF CYTOSKELETAL-DISRUPTING DRUGS.

Hepatocytes were incubated in the absence of any agent (basal) or with 10 nM vasopressin, 10 μ M angiotensin II or 10 μ M epinephrine for 5 min, without pretreatment (left panel). Cells were pretreated for 10 min either with 1 μ M okadaic acid, 1 μ M microcystin, 100 μ M chlorpromazine, 100 μ M W7 or 50 μ g/ml nystatin and incubated for further 5 min with the indicated hormone (right panels). Plotted are the means \pm S.E.M. of three experiments, each performed in triplicate, using different cell preparations.

has been reported that microcystin increases eicosanoid synthesis in some cells (NASEEM *et al.*, 1990). We tested the possibility that the action of okadaic acid could be mediated by eicosanoid production. In order to explore this, we incubated isolated hepatocytes with the cyclooxygenase inhibitor, indomethacin, for 20 min prior to okadaic acid treatment. However, this treatment prevented neither bleb formation nor inhibition of inositol phosphates production (data not shown).

Increases in intracellular calcium activate proteases which lead to the degradation of cytoskeletal proteins and appear to be responsible for the plasma membrane blebbing induced by agents that disrupt intracellular calcium homeostasis (NICOTERA *et al.*, 1986). Bleb formation and inhibition of phosphoinositide metabolism produced by okadaic acid was prevented neither by incubating the cells in buffer without calcium and containing 25 μ M EGTA nor by pretreatment with leupeptin (a protease inhibitor) (data not shown). In addition, we were unable to detect any change in intracellular calcium concentration induced by okadaic acid (recorded for 10 min) in rat hepatocytes. These observations suggest that an increase in cytosol calcium concentration is unlikely related to okadaic acid effects.

In summary, our data show that a series of unrelated agents which share the ability to alter cytoskeletal structure and induce blebbing also decrease receptor-mediated and G-protein mediated inositol phosphates production. The possibility that disruption of cytoskeletal structure may lead to G-protein-phospholipase C uncoupling is suggested. The molecular basis of such an effect remains to be elucidated.

Acknowledgements—The authors thank Ms GUADALUPE RAMÍREZ for skilfully typing the manuscript, Dr GLORIA GUTIÉRREZ-VEGAS for advice with the photomicrographs and MVZ HÉCTOR MALAGÓN and MVZ IGNACIO CABRERA for their help. This research was supported by Grants from CONACyT (0310-N9107) and DGAPA (IN-200193).

REFERENCES

- BERRIDGE, M. J., DAWSON, R. M., DOWNES, P., HESLOP, J. P. and IRVINE, R. F. (1983) Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* 212, 473-482.
- BERRY, M. N. and FRIEND, D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43, 505-520.
- BOE, R., GERTSEN, B. T., VINTERMYR, O. K., HOUGE, G., LANOTTE, M. and DOSKELAND, S. O. (1991) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 195, 237-246.
- BOUQUIGNON, L. Y., WALKER, G. and HUANG, H. S. (1990) Interaction between a lymphoma membrane-associated guanosine 5'-triphosphate-binding protein and the cytoskeleton during receptor patching and capping. *J. Immunol.* 144, 2242-2252.
- ERIKSSON, J. E., HÄGERSTRAND, H. and ISOMAA, B. (1987) Cell selective cytotoxicity of a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Biochem. biophys. Acta* 930, 304-310.
- ERIKSSON, J. E., TOIVOLA, D., MERILUOTO, J. A., KARAKI, H., HAN, Y. G. and HARTTHORN, D. (1990) Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 173, 1347-1353.
- ERIKSSON, J. E., BRAUTIGAN, D. L., VALLER, R., OLIMTED, J., FUJIKI, H. and GOLDMAN, R. D. (1992) Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11,903-11,907.
- GARCÍA-SÁINZ, J. A. and MACÍAS-SILVA, M. (1990) Angiotensin I stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylase through AII-1 receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 172, 780-785.
- GARCÍA-SÁINZ, J. A., MACÍAS-SILVA, M., HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S. M. T., TORRES-MÁRQUEZ, M. E., TRIVEDI, D. and HRUBÝ, V. J. (1990) Modulation of glucagon actions by phorbol myristate acetate in isolated hepatocytes. Effect of hypothyroidism. *Cell. Signal.* 2, 235-243.
- GARCÍA-SÁINZ, J. A., MACÍAS-SILVA, M. and ROMERO-AVILA, M. T. (1991) Effect of okadaic acid on hormone- and mastoparan-immunized phosphoinositide turnover in isolated rat hepatocytes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 179, 352-358.
- GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J., MACHESKY, L. M., BALDASTARE, J. J. and POLLARD, T. D. (1990) The actin-binding protein profilin binds to PIP₂ and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247, 1575-1578.
- GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J., KIM, J. W., MACHESKY, L. M., RIEE, S. G. and POLLARD, T. D. (1991) Regulation of phospholipase C- ϵ 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* 251, 1231-1233.
- GRONDIN, P., PLANTAVIO, M., SULTAN, C., BRETON, M., MAUCO, G. and CHAP, H. (1991) Interaction of pp60c-src, phospholipase C, inositol-lipid, and diacylglycerol kinases with the cytoskeleton of thrombin-stimulated platelets. *J. Biol. Chem.* 266, 15,705-15,709.
- HORTON, A. A. and WOOD, J. M. (1991) Prevention of Ca²⁺-induced or thromboxane B₂-induced hepatocyte plasma membrane bleb formation by thromboxane receptor antagonists. *Biochim. biophys. Acta* 1133, 31-37.
- IWIG, M., REINHARDT, E. and GLAESER, D. (1991) Influence of various drugs on the cytoskeleton and the proliferative growth of lens epithelial cells. *Acta Histochem.* 41 (Suppl.), 161-168.
- JANNEY, P. A. and STOSSEL, T. P. (1989) Gelsolin-polyphosphoinositide interaction. *J. Biol. Chem.* 264, 4825-4831.
- JEWELL, S. A., BELLOMO, G., THOR, H., ORRENIUS, S. and SMITH, M. T. (1982) Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium homeostasis. *Science* 217, 1257-1258.
- LASING, I. and LINDBERG, U. (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate and profilin. *Nature* 314, 472.
- MAYTINGLY, R. R. and GARRISON, J. C. (1992) Okadaic acid inhibits angiotensin II stimulation of ins(1,4,5)P₃ and calcium signalling in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 296, 225-230.
- MCFRIDE, K., RIEE, S. G. and JAKEN, S. (1991) Immunocytochemical localization of phospholipase C-gamma in rat embryo fibroblasts. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7111-7115.
- MOUSLY, M., BUER, J.-L., BRONNER, C., ROUOT, B. and LANDRY, Y. (1990) G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends pharmac. Sci.* 11, 358-362.
- NAKANO, T., HANASAKI, K. and ARITA, H. (1989) Possible involvement of cytoskeleton in collagen-stimulated activation of phospholipases in human platelets. *J. Biol. Chem.* 264, 5400-5406.
- NASEEM, S. M., HINES, H. B. and CREASIA, D. A. (1990) Inhibition of microcystin-induced release of cyclooxygenase products from rat hepatocytes by anti-inflammatory steroids. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 195, 345-349.

- NICOTERA, P., HARTZELL, P., DAVIS, G. and ORRENIUS, S. (1986) The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system. *FEBS Lett.* 209, 139-144.
- NICOTERA, P., BELLOMO, G. and ORRENIUS, S. (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Ann. Rev. Pharmac. Toxicol.* 32, 449-470.
- ORRENIUS, S., BURKITT, M. J., KASS, G. E., DYPBUKT, J. M. and NICOTERA, P. (1992) Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann. Neurol.* 32 (Suppl.), S33-S42.
- PAYRASTRE, B., VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M. P., BRETON, M., DEN HARTIGH, J. C., PLANTAVID, M., VERKLEIJ, A. J. and BOONSTRA, J. (1991) Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 115, 121-128.
- RUNNEGAR, M. T. C. and FALCONER, I. R. (1986) Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicol.* 24, 109-115.
- TASAKA, K., MINO, M., AKAGI, M., FUNSAWA, K. and AOKI, I. (1991) Role of cytoskeleton in Ca^{2+} release from the intracellular Ca store of rat peritoneal mast cells. *Agents Actions* 33, 44-47.
- WANG, N. and RASENICK, M. M. (1991) Tubulin-G protein interactions involve microtubule polymerization domains. *Biochemistry* 30, 10957-10965.
- WANG, N., YAN, K. and RASENICK, M. M. (1990) Tubulin binds specifically to the signal-transducing proteins, G_{α} and G_{β} . *J. Biol. Chem.* 265, 1239-1242.
- WANG, Y.-L. (1991) Dynamics of the cytoskeleton in live cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 27-32.

En adición a estos trabajos tenemos como datos no publicados que:

1) Las pozas de fosfoinosítidos marcadas con mio-inositol-[3H]: PI (fosfatidilinositol), PIP (fosfatidilinositol 4-monofosfato) y PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), no se afectan por el tratamiento de los hepatocitos con ácido okadaico o microcistina. (ver Tabla A).

TABLA A. EFECTO DE DOS INHIBIDORES DE PROTEINAS FOSFATASAS SOBRE LAS POZAS DE FOSFOINOSITIDOS MARCADAS CON TRITIO. (Los datos estan presentados en cpm/mg de células, peso húmedo).

	PIP2	PIP	PI
CONTROL	132 ± 27	51 ± 10	4568 ± 532
ACIDO OKADAICO	136 ± 34	49 ± 11	4766 ± 652
MICROCISTINA	139 ± 44	54 ± 15	4666 ± 672

2) El ácido okadaico y la microcistina no son capaces de inducir una movilización de calcio en hepatocitos aislados de rata. Este parámetro se evaluó midiendo espectrofotométricamente la concentración intracelular de calcio libre con el colorante fluorescente quin2.

3) El pretratamiento de los hepatocitos con leupeptina (un inhibidor de proteasas dependientes de calcio) o con indometacina (un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos) no previene o evita las acciones inhibitoras del ácido okadaico sobre la producción de fosfatos de inositol estimulada por vasopresina (ver figura A).

INOSITOL PHOSPHATES
(% OF VASOPRESSIN EFFECT)

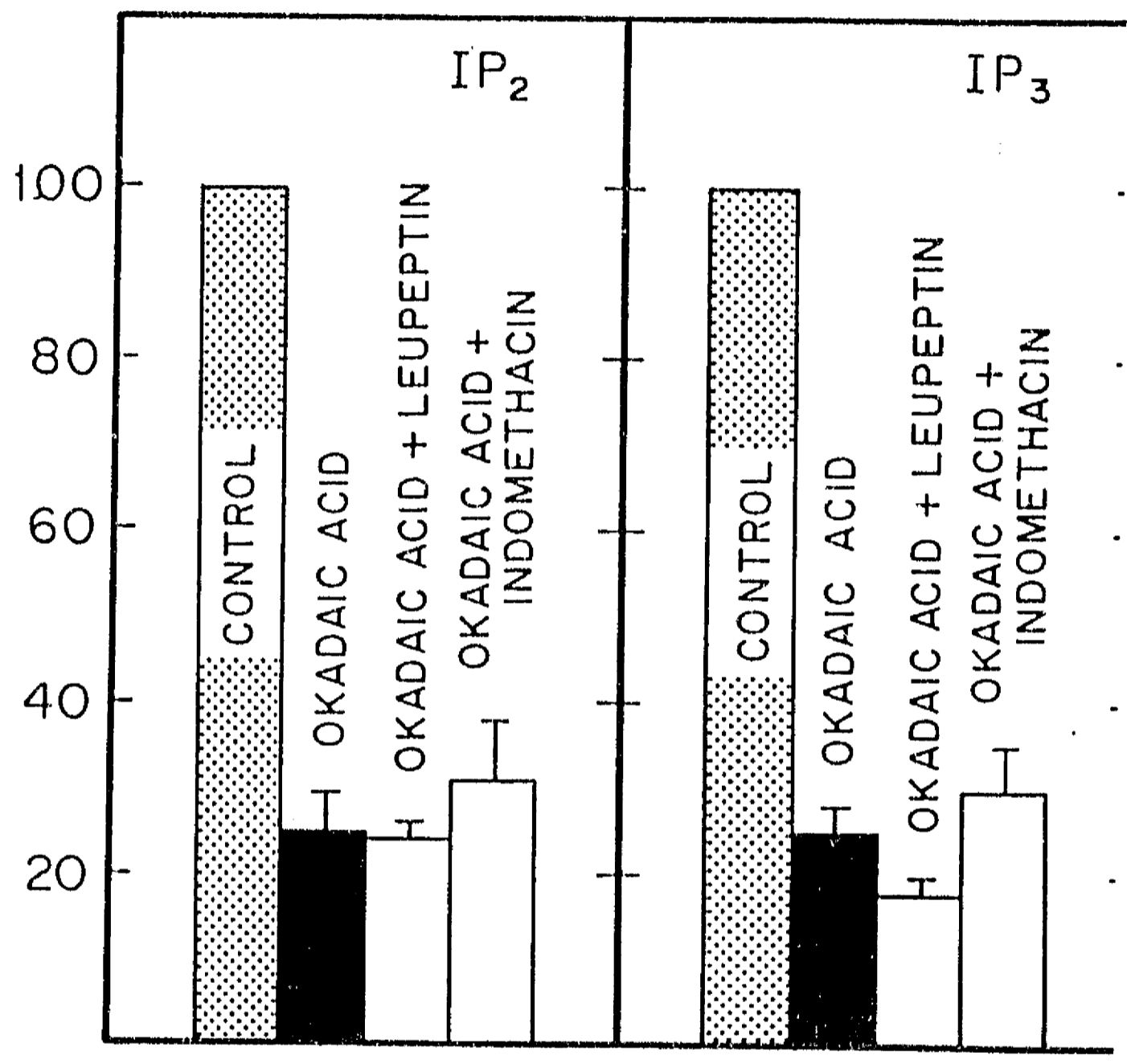


FIGURA A. Efecto de Leupeptina (un inhibidor de proteasas) e indometacina (un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos) sobre las acciones que ejerce el ácido okadaico sobre la producción de fosfatos de inositol estimulada por vasopresina.

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LOS TRABAJOS 2 Y 3.

La fosforilación reversible de proteínas es uno de los mecanismos bioquímicos más empleados por las células para regular diversos procesos. Por ejemplo, la función de los diversos componentes de los sistemas de transducción de señales hormonales pueden ser modulados por ciclos de fosforilación y desfosforilación. Diversos reportes apoyan lo anterior, en ellos se muestra la fosforilación de receptores, de proteínas G y de diversos efectores, como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C y los canales iónicos.

En este estudio nosotros observamos en el trabajo 2, que el ácido okadaico, un potente inhibidor de las proteínas fosfatasas 1 y 2A, disminuye parcialmente el marcaje de fosfatidilinositol y la producción de fosfatos de inositol estimulados por angiotensina II, vasopresina o epinefrina. No solamente el efecto de estas hormonas fué alterado sino que también se inhibe la estimulación de la producción de los fosfatos de inositol inducida por mastoparan, una toxina peptídica aislada del veneno de avispa que activa a las proteínas G mimetizando la acción de los receptores (Mously y col. 1990).

Nuestros resultados sugieren que la acción del ácido okadaico no es ejercida a nivel de los receptores sino a otro nivel del sistema, probablemente sobre la proteína G o sobre la fosfolipasa C. Recientemente, nuestros datos han sido confirmados por Mattingly y Garrison, 1992; este grupo encontró que la producción de inositol trifosfato (IP3) y el aumento de calcio citosólico estimulado por angiotensina II, es inhibido por el

ácido okadaico en hepatocitos de rata, ellos muestran también que la actividad de la cinasa del IP3 se incrementa.

En la última parte de este proyecto decidimos tratar de establecer el mecanismo, empleado por los inhibidores de fosfatasas, para bloquear el metabolismo de fosfoinosítidos estimulado por hormonas.

Recientemente se describió la existencia de una relación muy importante entre algunos elementos del citoesqueleto y algunos de los componentes del sistema de transducción fosfoinosítidos-calcio, tales como la fosfolipasa C, los fosfoinosítidos, las diacilglicerol cinasas y las fosfoinosítido cinasas (Nakano y col. 1989, Grondin y col. 1991; Mc Bride y col. 1991; Payraastre y col. 1991; Goldschmidt-Clermont y col. 1990, 1991). Además, en los últimos años se ha propuesto que el citoesqueleto juega un papel muy importante en la modulación de la transducción de las señales hormonales (Wang y col. 1990; Wang y Rasenick, 1991). Todo esto, aunado al hecho de que varios agentes perturbadores del citoesqueleto inhiben el metabolismo de fosfoinosítidos estimulado por hormonas (Nicotera y col. 1992), nos llevó a tratar de establecer si la integridad del citoesqueleto es importante en las acciones que el ácido okadaico ejerce sobre el recambio de fosfoinosítidos, sobre todo considerando que el ácido okadaico y la microcistina alteran la estructura del citoesqueleto en varios tipos celulares (Boe y col. 1991; Eriksson y col. 1987, 1990, 1992; Naseem y col. 1990; Runnegar y col. 1986).

En el trabajo 3, mostramos indirectamente que la inhibición de las proteínas fosfatasas 1 y 2A, por el ácido okadaico y la microcistina, conducen a una alteración en la estructura del

citoesqueleto ya que inducen la formación de "ampollas" en la membrana plasmática de los hepatocitos de rata. Este fenómeno resultó estar asociado con una marcada inhibición del recambio de fosfoinosítidos estimulado por hormonas, como angiotensina II, vasopresina y epinefrina. Para apoyar este hallazgo decidimos investigar los efectos que varias drogas perturbadoras del citoesqueleto, como la clorpromazina, el W7 y la nistatina, ejercen sobre la producción de fosfatos de inositol estimulada por vasopresina. Nuestros datos muestran que estas drogas mimetizan las acciones que los inhibidores de fosfatasas tienen sobre la formación de ampollas y la inhibición del metabolismo de fosfoinosítidos estimulado por hormonas. Aunque, el mecanismo por el cual todas estas drogas ejercen sus efectos sobre el citoesqueleto aún se desconoce, estos resultados sugieren que la integridad del citoesqueleto es importante para una eficiente transducción de las señales hormonales.

Se ha establecido que la fosforilación por cinasas de proteínas es un factor clave en la regulación de la estructura del citoesqueleto, y ahora también se están valorando las posibles funciones que las fosfatasas de proteínas también puedan ejercer sobre la regulación del mismo. De tal manera que son muchos los estudios que muestran la existencia de cambios en la estructura del citoesqueleto acompañados de un incremento en la fosforilación de algunos de sus componentes, sugiriendo claramente que la fosforilación de proteínas es esencial en el mantenimiento de la integridad estructural del citoesqueleto.

Datos complementarios a este trabajo muestran que las

acciones que tiene el ácido okadaico no están relacionadas con una alteración en las pozas de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato o de sus precursores el PIP y el PI ya que como se muestra en la tabla A, observamos que el pretratamiento de los hepatocitos con okadaico o microcistina no alteran el marcaje de los fosfoinosítidos con el inositol tritiado, descartando así la posibilidad de que el ácido okadaico tuviera algunas acciones sobre las enzimas que controlan los niveles de fosfoinosítidos.

Por otro lado, también observamos que las alteraciones del citoesqueleto no están relacionadas con un cambio en los niveles de calcio citosólico, que generalmente llevan a la activación de proteasas sensibles a calcio o a la síntesis de eicosanoides como los tromboxanos, que como se sabe pueden participar en el daño celular (Horton y Wood, 1991; Jewell y col. 1982; Nicotera y col. 1992). Esta conclusión está apoyada por los estudios realizados con el colorante fluorescente quin2, que muestran que los inhibidores de las fosfatasas no inducen un aumento en la concentración de calcio citosólico. Además, en la fig. A podemos observar que el pretratamiento de los hepatocitos con leupeptina, un inhibidor de proteasas, o con indometacina, un bloqueador de la síntesis de eicosanoides, no revierten el efecto que los inhibidores de fosfatasas ejercen sobre la producción de fosfatos de inositol estimulada por vasopresina.

A pesar de que no ha quedado bien entendida la manera en la cual interactúan los componentes del citoesqueleto con los diferentes sistemas de transducción, se ha observado que uno de los mecanismos por los cuales el citoesqueleto está implicado en la transducción de las señales hormonales, puede ser vía el

secuestro de diferentes moléculas reguladoras, llevándolas a diferentes lugares en la célula. Es posible que el tratamiento con agentes perturbadores del citoesqueleto, como el ácido okadaico o la microcistina, pueda permitir una asociación entre las proteínas Gq o fosfolipasa C (PLC) y alguno de los elementos del citoesqueleto de tal manera que sean transportados a otro sitio donde esten aislados del sistema, es decir, puede ocurrir que la fosforilación, de Gq (proteína que acopla a los receptores con la PLC), de la PLC o de alguno de los elementos del citoesqueleto, permita que formen complejos entre ellos y se alejen de la membrana, desacoplándose así el sistema de transducción. Esto se basa en la idea de que el citoesqueleto regula de alguna manera la compartimentalización de algunas moléculas reguladoras en respuesta a ciertas señales en la superficie celular.

Es importante señalar que, aunque los datos sugieren que la alteración del citoesqueleto parece jugar un papel muy importante en el mecanismo de acción empleado por el ácido okadaico o la microcistina para inhibir el metabolismo de fosfoinosítidos estimulado por hormonas, estos datos no son concluyentes ya que no podemos descartar que estos inhibidores de fosfatasa de proteínas puedan también modular el estado de fosforilación de algunas proteínas claves en la activación de este sistema de transducción hormonal.

Existe evidencia de que los componentes del sistema de transducción fosfoinosítidos-calcio, pueden ser modulados por fosforilación, por lo tanto es importante considerar esta idea como hipótesis alternativa para explicar las acciones que los

inhibidores de fosfatasa de proteínas ejercen sobre dicho sistema de transducción.

Las estrategias a seguir para demostrar la fosforilación de las proteínas Gq o PLC implican disponer de ciertas herramientas como son los anticuerpos específicos dirigidos contra ellas. Los anticuerpos contra varias de las isoenzimas de PLC (PLC β 1, PLC δ 1 y PLC ζ 1) se encuentran disponibles comercialmente, mientras que en el caso de las proteínas Gq, hemos logrado obtener anticuerpos bastante específicos que reconocen el decapeptido carboxilo terminal de esta proteína, además se logró también obtener anticuerpos contra una región común en las subunidades beta de las proteínas G. Actualmente estamos tratando de estudiar la fosforilación de estas proteínas mediante estudios de inmunoprecipitación, con el objeto de lograr establecer si la fosforilación de estas proteínas es inducida durante el tratamiento celular con los inhibidores de proteínas fosfatasas. Experimentos en progreso se están realizando para elucidar este fenómeno.

REFERENCIAS

- Ambroz, C, AJL Clark y KJ Catt, *Bioch Biophys Acta* (1991) 1133, 107-111.
- Anand-Srivastava, MB, *Bioch Biophys Res Com* (1983) 117,420-428.
- Bauer, PH, AT Chiu y JC Garrison, *Mol Pharm* (1991) 39,579-585.
- Boe, R, BT Gjertsen, OK Vintermyr, G Houge, M Lanotte y SO Doskeland, *Exp Cell Res* (1991) 195, 237-246.
- Bottari, SP, V Taylor, IN King, Y Bogdal, S Whitebread y M de Gasparo, *Eur J Pharm* (1991) 207,157-163.
- Bottari, SP, IN King, S Reichlin, I Dahlstroem, N Lyndon y M de Gasparo, *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 183,206-211.
- Bushfield, M, BE Lavan y MD Houslay, *Biochem J* (1991) 274,317-321.
- Campanille, CP, JK Crane, J Peach y JC Garrison, *J Biol Chem* (1982) 257,4951-4958.
- Cárdenas-Tanús, R, J Huerta-Baena y JA García-Sáinz, *FEBS Lett* (1982) 143, 1-5.
- Carmichael, WW, en *Marine Toxins* (1991) 264-266.
- Catt, K y A Abbot, *TIPS* (1991) 12,279-281.
- Chang, RSL y VJ Lotti, *Life Sci* (1991) 49,1485-1490.
- Chaki, S y T Inagami, *Eur J Pharm* (1992) 225,355-356.
- Chiu, AT, DE McCall, TT Nguyen, DJ Carini, JV Duncia, WF Herblin, RT Uyeda, PC Wong, RR Wexler, AL Johnson y PBMWM Timmermans, *Eur J Pharm* (1989a) 170,117-118.
- Chiu, AT, WF Herblin, DE McCall, RJ Ardechy, DJ Carini, JV Duncia, LJ Pease, PC Wong, RR Wexler, AL Johnson y PBMWM Timmermans, *Biochem Biophys Res Com* (1989b) 165,196-203.

- Chiu, AT, JV Duncia, DE McCall, PC Wong, WA Price JR, MJMC Thoolen, CJ Carini, AL Johnson y PBMWM Timmermans, J Pharm Exp Ther (1989c) 250, 867-874.
- Chiu, AT, DE McCall, WA Price, PC Wong, DJ Carini, JV Duncia, RR Wexler, SE Yoo, AL Johnson y PBMWM Timmermans, J Pharm Exp Ther (1990a) 252, 711-718.
- Chiu, AT, DE McCall, RJ Ardecky, JV Duncia, TT Nguyen y PBMWM Timmermans, Receptor (1990b) 1,33-40.
- Chiu, AT, DE McCall, PE Aldrich y PBMWM Timmermans, Biochem Biophys Res Com (1990c) 172,1195-1202.
- Cicirelli, MF, FOCUS (1992) 14, 16-20.
- Crane, JK, CP Campanille y JC Garrison, J Biol Chem (1982) 257,4959-4965.
- Cohen, C, Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85,2412-2416.
- Cohen, P, Annu Rev Biochem (1989) 58, 453-508.
- Cohen, P, CFB Holmes, Y Tsukitani, TIBS (1990) 15, 98-102.
- Cohen, P, Methods in Enzymology (1991) 201, 389-399.
- D'Auriac, GA, M Baudouin y P Meyer, Circul Res (1972) XXX y XXXI, II-151-II-157.
- Desarnaud, F, J Marie, C Lombard, R Larguier, R Seyer, T Lorca, S Jard y JC Bonnafous, Biochem J (1993) 289, 289-297.
- Dudley, DT, RL Panek, TC Major, GH Lu, RF Bruns, BA klinkefus, JC Hidges y RE Weishaar, Mol Pharm (1990) 38,370-377.
- Enjalbert, A, F Sladeczek, G Guillon, P Bertrand, C Shu, J Epelbaum, A García-Sáinz, S Jard, C Lombard, C Kordon y J Bockaert, J Biol Chem (1986) 261,4071-4075.

- Eriksson, JE, H Hägerstrand y B Isomaa, *Biochem Biophys Acta* (1987) 930, 304-310.
- Eriksson, JE, D Toivola, JA Meriluoto, H Karaki, YG Han y D Hartshorne, *Biochem Biophys Res Commun* (1990) 173, 1347-1353.
- Eriksson, JE, DL Brautigan, R Vallee, J Olmsted, H Fujiki y RD Golman, *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89, 11093-11097.
- García-Sáinz, JA, *TIPS* (1987) 8, 48-49.
- García-Sáinz, JA y M Macías-Silva, *Biochem Biophys Res Commun* (1990) 172, 780-785.
- Garrison, JC y MJ Peach, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman-Gilman, A, TW Rall, AS Nies y P Taylor editores. Ed Pergamon Press, USA) (1990) p 749-763.
- Goldschmidt-Clermont, PJ, LM Machesky, JJ Baldassare y TD Pollard, *Science* (1990) 247, 1575-1578.
- Goldschmidt-Clermont, PJ, JW Kim, LM Machesky, SG Rhee y TD Pollard, *Science* (1991) 251, 1231-1233.
- Grondin, P, M Plantavid, C Sultan, M Breton, G Mauco y H Chap, *J Biol Chem* (1991) 266, 15705-15709.
- Griendling, KK, SE Rittenhouse, TA Rock, KS Ekstein, MA Gimbrone y RW Alexander, *J Biol Chem* (1986) 261, 5901-5906.
- Gunther, S, *J Biol Chem* (1984) 259, 7622-7629.
- Hardie, DG, TAJ Haystead y ATR Sim, *Methods in Enzymol* (1991) 201, 469-477.
- Hatch, GM, H Jamil, AK Utal y DE Vance, *J Biol Chem* (1992) 267, 15751-15758.
- Hausdorff, WP y KJ Catt, *Endocrin* (1988) 123, 2818-2826.
- Haystead, TAJ, ATR Sim, D Carling, RC Honnor, Y Tsukitani, P Cohen y DG Hardie, *Nature* (1989) 337, 28-31.

Hescheler, J, W Rosenthal, KD Hinsch, M Wulfern, W Trautwein y G Schultz, EMBO J (1988) 7,619-624.

Horton, AA y JM Wood, Biochem Biophys Acta (1991) 1133, 31-37.

Iwai, N y T Inagami, FEBS Lett (1992) 298,257-260.

Jackson, TR, LAC Blair, J Marshall, M Goedert y MR Hanley, Nature (1988) 335,437-440.

Janmey, PA y TP Stossel, J Biol Chem (1989) 264, 4825-4831.

Jard, S, B Cantau y KH Jakobs, J Biol Chem (1981) 256, 2603-2606.

Jewell, SA, G Bellomo, H Thor, S Orrenius y MT Smith, Science (1982) 217, 1257-1258.

Johnson, RM y JC Garrison, J Biol Chem (1987) 262,17285-17293.

Kojima, I, H Shibata y E Ogata, FEBS Lett (1986) 204,347-351.

Lassing, I y U Lindberg, Nature (1985) 314, 472.

Lynch, CJ, V Prpic, PF Blackmore y JH Exton, Mol Pharm (1985) 29,196-203.

Marie, J, RC Gaillard, P Schoenenberg, S Jard y J Bockaert, Endocrin (1985) 116,1044-1050.

Mattingly, RR y JC Garrison, FEBS Lett (1992) 296, 225-230.

Mendelsohn, FAO, AM Allen, SY Chai, MJ McKinley, BJ Oldfield y G Paxinos, TEM (1990) March/April,189-198.

Millan, MA, DM Jacobowitz, G Aguilera y KJ Catt, Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88,11440-11444.

Mously, M, JL Bueb, C Bronner, B Rouot y Y Landry, Trends Pharmacol Sci (1990) 11, 358-362.

Murphy, TJ, RW Alexander, KK Griendling, MS Runge y KE

ESTA TEXA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Bernstein, Nature (1991) 351,233-236.
- Nakano, T, K Hanasaki y H Arita, J Biol Chem (1989) 264, 5400-5406.
- Naseem, SM, HB Hines y DA Creasia, Proc Soc Exp Biol Med (1990) 195, 345-349.
- Nicotera, P, G Bellomo y S Orrenius, Annu Rev Pharmacol Toxicol (1992) 32, 449-470.
- Payrastre, B, PMP Van Bergen En Henegouwen, M Breton, JC Hartigh, M Plantavid, AJ Verkleij y J Boonstra, J Cell Biol (1991) 115, 121-128.
- Pfeilfchifter, J y C Bauer, Biochem J (1986a) 236,289-294.
- Pfeilfchifter, J, FEBS Lett (1986b) 203,262-266.
- Pfeilfchifter, J, A Huwiler, C Merriweather y VA Briner, Eur J Pharm (1992) 225,57-62.
- Pobiner, BF, EL Hewlett y JC Garrison, J Biol Chem (1985) 260,16200-16209.
- Pobiner, BF, JK Northup, PH Bauer, ED Fraser y JC Garrison, Mol Pharm (1991) 40,156-167.
- Pushpendran, CK, S Corvera y JA García-Sáinz, FEBS Lett (1983) 160,198-202.
- Re RN, AA Macphee y JT Fallon, Clin Sci [Suppl 7] (1981) 61,245s-247s.
- Re RN, DC Vizard, J Brown y SE Bryan, Biochem Biophys Res Commun (1984) 119,220-227.
- Rogers, T, J Biol Chem (1984) 259,8106-8114.
- Rogg, H, A Schmid y M de Gasparo, Biochem Biophys Res Com (1990) 173,416-422.
- Rowe, BP, KL Grove, DL Saylor y RC Speth, Eur J Pharm (1990)

- 186, 339-342.
- Runnegar, MTC y IR Falconer, *Toxicon* (1986) 24, 109-115.
- Sandberg, K, H Ji, MA Millan y KJ Catt, *FEBS Lett* (1991) 284, 281-284.
- Sasaki, K, Y Yamano, S Bardhan, N Iwai, JJ Murray, M Hasegawa, Y Matsuda y T Inagami, *Nature* (1991) 351, 230-232.
- Schönthal, A, *The New Biologist* (1992) 4, 16-21.
- Sen, I, KF Jim y RL Soffer, *Eur J Pharm* (1983) 136, 41-49.
- Sen, I, HG Bull y RL Soffer, *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) 81, 1679-1683.
- Shenolikar, S, *FASEB J* (1988) 2, 2753-2764.
- Speth, K y KH Kim, *Biochem Biophys Res Com* (1990) 169, 997-1006.
- Strömberg, C, K Tsutsumi, M Viswanathan y JM Saavedra, *Eur J Pharm* (1991) 208, 331-336.
- Sumners, C, W Tang, B Zellezna y MK Raizada, *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88, 7567-7571. Timmermans, PBMW, PC Wong, AT Chiu y WF Herblin, *TIPS* (1991) 12, 55-67.
- Tang SS, H Rogg, R Schumacher y VJ Dzau, *Endocrinology* (1992) 131, 374-380.
- Tsutsumi, K y JM Saavedra, *Cell Mol Neurobiol* (1991) 11, 295.
- Uhing, RJ, V Prpic, H Jiang y JH Exton, *J Biol Chem* (1986) 261, 2140-2146.
- Valloton, MB, *TIPS* (1987) 8, 69-74.
- Wang, N, K Yan y MM Rasenick, *J Biol Chem* (1990) 265, 1239-1242.
- Wang, N y MM Rasenick, *Biochemistry* (1991) 30, 10957-10965.

- Whitebread, S, M Mele, B Kamber y M de Gasparo, Biochem Biophys Res Com (1989) 163,284-291.
- Wong, PC, SD Hart, AM Zaspel, AT Chiu, RJ Ardecky, RD Smith y PBMWM Timmermans, J Pharm Exp Ther (1990a) 255,584-592.
- Wong, PC, AT Chiu, WA Price, MJMC Thoolen, DJ Carini, AL Johnson, RI Taber y PBMWM Timmermans, J Pharm Exp Ther (1988) 247,1-8.
- Wong, PC, TM Reilly y PBMWM Timmermans, Eur J Pharm (1990b) 186, 353-356.
- Wong, PC, WA Price, AT Chiu, JV Duncia, DJ Carini, RR Wexler, AL Johnson y PBMWM Timmermans, J Pharm Exp Ther (1990c) 252,719-725.
- Wong, PC, WA Price, AT Chiu, JV Duncia, DJ Carini, RR Wexer, AL Johnson y PBMWM Timmermans, J Pharm Exp Ther (1990d) 252,726-732.
- Yamazaki, M y N Toda, Eur J Pharm (1991) 201, 223-229.
- Young, D, G Waltches, C Birchmeier, O Fasano y M Wigler, Cell (1986) 45,711-719.