

00322

179

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EL ACIDO LISOFOSFATIDICO PROMUEVE LA
FOSFORILACION DEL RECEPTOR ALFA-1B ADRENERGICO
MEDIANTE LA TRANSACTIVACION DEL RECEPTOR
PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGO**

**PRESENTA:
ALEJANDRO RUIZ MARTINEZ**

**DIRECTOR DE TESIS.
DR. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

... a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
contenido de mi trabajo recepcionado

NOMBRE: Alejandro Ruiz

Martínez

FECHA: 25 Junio - 03

FIRMA: [Signature]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la

Facultad de Ciencias

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "El ácido lisofosfatídico promueve la fosforilación del receptor alfa-1b adrenérgico mediante la transactivación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico" realizado por **Alejandro Ruiz Martínez**

con número de cuenta 9653319-2, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Propietario

Dra. Patricia Casas González

Propietario

Dra. Rocío Alcántara Hernández

Suplente

Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez

Suplente

Biol. Selma Eréndira Avendaño Vázquez

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



DEPARTAMENTO DE...

1. B

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz. Este proyecto fué apoyado por la DGAPA (IN-205199) y el CONACyT.

1.0

A *Eva y Carlos*, por ser mi mejor ejemplo de empeño y los mejores amigos que he tenido.

A *Laura y Maira*, por todo que han representado para mí y su apoyo en todo momento.

A *María...* por todo el apoyo brindado en todo momento.

A *los Hurdies*, por tantas horas de ruido y camaradería.

A *mis amig@s de la Facultad*, por enriquecer mi estancia en ese lugar y ayudarme a pasar las mejores experiencias que brinda esta carrera.

A *mis amig@s de Universum* por ayudarme a ver la ciencia de otro modo y ser el mejor equipo de trabajo en el que he participado.

Agradecimientos:

Al Dr. J. Adolfo García Sáinz por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A los miembros del laboratorio, Paty, Rocío, Tere, Ere, Citlali y Tzindi, de quién siempre recibí su ayuda y amistad.

A mis maestros de la carrera.

A toda la gente que me ha apoyado para lograr esto, mil gracias.

“El ácido lisofosfatídico promueve la fosforilación del receptor alfa-1b adrenérgico mediante la transactivación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico”

ÍNDICE.

Parte 1. Introducción general.

I.	Comunicación celular	1
II.	Tipos de comunicación celular	2
III.	Hormonas	3

Parte 2. Respuestas celulares: transducción de la señal.

IV.	Receptores celulares.....	6
V.	Receptores acoplados a proteínas G.....	10
VI.	Proteínas G.....	12
VII.	Vías de transducción de los GPCRs.....	15
	Sistema de la adenilato ciclasa.....	15
	Sistema de fosfoinosítidos-calcio.....	17
VIII.	Mecanismos de regulación de los GPCRs.....	19
	A) Desensibilización.....	20
	Desensibilización homóloga.....	21
	Arrestinas en la desensibilización homóloga.....	21
	Internalización de GPCRs	23
	Desensibilización heteróloga.....	25
	B) Fosforilación.....	26
	Cinasas activadas por segundos mensajeros.....	26
	Cinasas de GPCRs o GRKs.....	27
	Receptores con actividad de cinasa de tirosina.....	28
IX.	Receptores adrenérgicos.....	29
	Receptor α_{1B} -adrenérgico (sistema de estudio).....	30
X.	El Ácido Lisofosfatídico.....	34
	Receptores para LPA.....	35
	Vías de señalización para LPA.....	35
	La fosfatidil-inositol-3-cinasa o PI3K.....	36
	Activación de la PI3K por LPA: participación de p110 β	37

XI.	El receptor par EGF.....	38
	Transactivación del receptor para EGF.....	39
	Metaloproteasas.....	40

Parte 3. Trabajo de tesis.

Antecedentes.....	42
Objetivos.....	44
Materiales y métodos.....	45
Resultados.....	48
Discusión.....	55
Conclusiones.....	60
Referencias.....	61

Abreviaciones utilizadas en este trabajo:

α_{1b} -AR: receptor alfa-1b adrenérgico
AC: adenilato ciclasa o adenilil ciclasa
ADP: adenosin difosfato
AMPc: adenosin monofosfato cíclico
ATP: adenosin trifosfato
 β ARK: cinasa del receptor beta-adrenérgico
DAG: diacilglicerol
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGFR: receptor para el factor de crecimiento epidérmico
ET: endotelina
GABA: ácidp gamma-amino butírico
GC: guanilato ciclasa
GDP: guanosin bifosfato
GMPc: guanosin monofosfato cíclico
GPCR: receptor acoplado a proteínas G
GRK: cinasa de receptores acoplados a proteínas G
GTP: guanosin trifosfato
HB-EGF: "Heparin Binding-Epidermal Growth Factor"
LPA: ácido lisofosfatídico
LPAR: receptor para el ácido lisofosfatídico
MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos
MMP: metaloproteasas de membrana
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK: proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos
PI3K; fosfatidil-inositol-3-cinasa
PKA, PKB: proteínas cinasas A, B
PKC: proteínas cinasa C
PKG: proteína cinasa dependiente de GMP cíclico
PLC, PLD: fosfolipasa C, D
PTX: toxina *pertussis*
RTK: receptor con actividad de cinasa de residuos de tirosina
ST: estaurosporina
WT: wortmanina

PARTE 1.

INTRODUCCIÓN.

Con el objetivo de ubicar a este trabajo con claridad dentro del campo específico de la Transducción de Señales, se ha escrito en tres partes principales, una introducción general sobre la comunicación celular, una introducción específica sobre la transducción de señales y por último el desarrollo del trabajo de tesis.

I. Comunicación celular.

Esta bien establecido que la célula es la unidad anatómica y funcional de todo ser vivo. Los seres vivos más sencillos, los unicelulares, constituyen ya una intrincada máquina bioquímica capaz ajustarse a cambios importantes en su ambiente. Hace 3,500 millones de años existían organismos de una complejidad equiparable a la de las bacterias y debieron tener alguna forma esencial de comunicación. Puede asumirse que desde entonces existen formas básicas de comunicación celular, presentes incluso en los organismos más sencillos y con implicaciones relevantes para su sobrevivencia, determinada a su vez por la capacidad de responder favorablemente a los estímulos ambientales. Esa capacidad se llama "plasticidad" y es la que a largo plazo determina el éxito evolutivo de las especies.

Cabe mencionar que los primeros estudios sobre la comunicación celular fueron sobre fenómenos relacionados con la comunicación entre los órganos internos de los animales, realizados por Aristóteles (400 a. C.) y Galeno (400 d. C.). Posteriormente los estudios de Claude Bernard en el siglo XIX sobre la "secreción interna" de esos órganos y los de Bayliss y Starling sobre la estimulación a distancia del páncreas, fueron dando base a una nueva área del conocimiento biológico llamada Endocrinología (del griego "*endos*" = interno y "*krinos*" = secreción) (Loriaux, 1995).

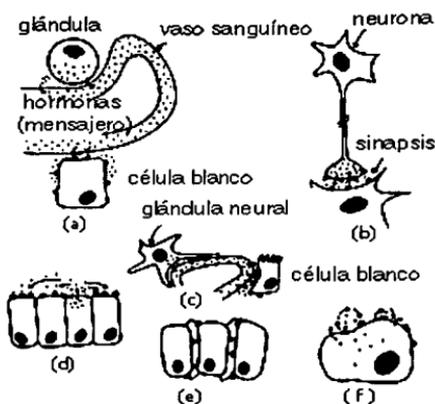
Una célula puede "reconocer" los mensajes que envía otra célula gracias a un elemento en su superficie. Este elemento lo constituye una entidad física denominada "receptor". A la sustancia que sirve como "mensajero" entre las células se le denomina "hormona" y fue de hecho el Prof. Starling quien en 1905 acuñó el término según su etimología griega "*Hormaein*" ("estimular") y desde entonces se maneja este concepto para hablar en forma general de mensajeros químicos (Loriaux, 1995).

II. Tipos de comunicación celular.

Uno de los sistemas de comunicación celular mas sofisticados es aquel que involucra a las hormonas. La complejidad de este sistema radica en que participan un gran número de mensajeros bioquímicos específicos para una célula o tejido determinados, que son factores que elevan el número y complejidad de las respuestas fisiológicas celulares.

Los tipos de comunicación se basan principalmente en consideraciones histológicas, citológicas y fisiológicas; de esta forma se clasifican de la siguiente manera:

- A. Comunicación endocrina:** en este tipo de comunicación una célula o glándula endocrina como el hipotálamo, tiroides, hipófisis, etc., secreta al torrente sanguíneo un mensajero específico u hormona la cual, gracias a la circulación sanguínea, puede llegar prácticamente a cada rincón de un organismo y es reconocido por células a las que se les llama "**célula blanco**" cuya capacidad de reconocer al mensajero les está dada por poseer los receptores específicos. Aquí se incluye a la "comunicación neuroendocrina" o "neurosecreción", donde participan células del sistema nervioso con capacidad endocrina (por ejemplo el sistema hipotálamo-hipófisis) (Alberts, *et al.* 1994, García Sáinz, 2002).
- B. Comunicación paracrina:** aquí las células secretan hormonas o mediadores locales también llamados autacoides (del griego "*Auto*"=propia y "*akos*"=remedio). Estos actúan solamente en las células vecinas a la que liberó la hormona, ya que pueden difundir en el espacio extracelular solo por un corto tiempo (por ejemplo las prostaglandinas). Aquí se incluye a la "neurotransmisión" o comunicación sináptica, en la que una célula nerviosa (presináptica) libera a un mensajero (neurotransmisor) hacia el espacio sináptico muy cerca de otra célula nerviosa (postsináptica) o muscular (Alberts, *et al.* 1994, García Sáinz, 2002).
- C. Comunicación autocrina:** aquí las células reconocen y responden a hormonas que ellas mismas liberaron a su espacio extracelular gracias a receptores específicos en su propia membrana, por ejemplo el sistema de receptores para los factores de crecimiento (Voet and Voet, 1992).
- D. Comunicación yuxtacrina:** aquí células adyacentes se comunican con un mensajero anclado exteriormente en su membrana y se une a su receptor en la membrana de la otra célula. El Dr. Massagué acuñó este concepto al encontrar que esta es la forma en la que se reconoce al Factor de Crecimiento Transformante tipo alfa (TGF- α) (García Sáinz, 2002) (ver Wrana *et al.*, 1994).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 1. Tipos de comunicación celular por mensajeros químicos: a) comunicación endocrina, b) neurotransmisión, c) comunicación neuroendocrina, d) comunicación paracrina, e) comunicación juxtacrina y f) comunicación autocrina. Tomado de García-Saíenz, 2002.

“ Una célula puede llevar a cabo estos tipos de comunicación simultáneamente. Tiene receptores de distintos tipos y da respuesta específica a cada uno de esos estímulos. Se trata entonces, de un gran conmutador fisiológico en miniatura.

III. Hormonas.

Como ya se mencionó, esencialmente las hormonas son sustancias que actúan como **mensajeros químicos** y las podemos encontrar en toda la escala animal, (también existen moléculas con funciones análogas en las plantas y se les llaman “hormonas vegetales”). Hay autores que consideran como hormonas solamente a las secretadas al torrente sanguíneo (a las que generalmente se les da el nombre de **primeros mensajeros**) por glándulas endocrinas especializadas (Hardie, 1991). Sin embargo, si apelamos al concepto original de hormonas como sustancias que “estimulen” y se comporten como “mensajeros químicos”, nos daremos cuenta de que su naturaleza puede variar, ya que puede ser un aminoácido (como la glicina) o derivados de él, una proteína o péptido, un esteroide e incluso un gas, (como por ejemplo el óxido nítrico y el monóxido

de carbono) (Cooper, 2000). En la tabla 1 se ejemplifican algunas hormonas bien conocidas, así como su naturaleza química y el sistema hormonal en el que participan.

Existen hormonas hidrofóbicas e hidrofílicas. Las primeras, como los esteroides, la tiroxina y el ácido retinoico (un regulador importante durante el desarrollo embrionario de los vertebrados), pueden atravesar la membrana celular y activar a sus receptores localizados en el citoplasma o el núcleo. Las hormonas hidrofílicas como los aminoácidos y péptidos, activan a sus receptores que están embebidos en la membrana plasmática y la respuesta celular a estos estímulos dependerán de una vía de transducción, la cual inicia con la unión del mensajero con el receptor.

Tabla 1. Ejemplos de hormonas.

SISTEMA HORMONAL	PÉPTIDO O PROTEÍNA	ESTEROIDE	AMINOÁCIDO O DERIVADO
Hipotálamo	Hormona liberadora de Gonadotropinas		
Tiroides			Tiroxina (T ₃) Triiodotironina (T ₄)
Páncreas	Insulina, glucagon, somatostatina		
Sexual (masc. y femenino)	H. luteinizante, prolactina, oxitocina	Estradiol, progesterona, testosterona	
Médula Adrenal			Epinefrina Norepinefrina
Pineal			Melatonina y serotonina
Eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales	Angiotensina, ACTH	Cortisol y aldosterona	

ACTH, hormona adrenocorticotrópica; H., hormona; *masc.*, masculino.

Fuente: Norman, 1997.

A la hormona que se une a un receptor también se le llama "**ligando**" y puede ser un mensajero natural o sintético. Al ligando que se une a un receptor y lo activa se le llama **agonista**. Como ejemplos están la insulina, la adrenalina, la histamina, serotonina, etc. Aquel agente que ocupa a un receptor y no lo activa pero además evita que los agonistas lo hagan se le llama **antagonista**. La importancia de estos agentes radica en que sirven como reguladores negativos de la función de los receptores activados. Un ejemplo de esta regulación por agonistas y antagonistas ocurre con los receptores para histamina, la cual participa en reacciones de hipersensibilidad y alérgicas. Ante estímulos traumáticos (como un golpe) o alérgicos, la histamina activa a sus receptores en la membrana celular y desencadena las respuestas características de la reacción (salpullido, inflamación, etc.).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estas son controladas con agentes que bloquean la acción del agonista histamina, es decir antagonistas de esta hormona, como la ranitidina y clorfenamina, cuyos efectos bloquean los de la reacción alérgica, por lo que son llamados anti-histamínicos.

Existen también otros agentes que actúan de manera contraria a como lo hace un agonista, es decir que no lo activa e inhiben su función y además se unen con mayor afinidad al receptor inactivo; se llaman **agonistas inversos**. Estos agentes son usados ampliamente en el estudio farmacológico y funcional de un gran número de receptores y son importantes por su potencial uso clínico.

PARTE 2.

RESPUESTAS CELULARES: TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL.

Para que una señal extracelular pueda ser traducida a una respuesta fisiológica, la célula necesita un **sistema de transducción de la señal**, es decir requiere de elementos que le permitan convertir la señal o estímulo en una respuesta. Estos elementos los constituyen proteínas de la célula con funciones especializadas en cada etapa de la reacción ante el estímulo. En general, un sistema clásico de transducción requiere de tres partes: el **mensajero** u hormona, el **receptor**, que se encargará de reconocer al estímulo, el cual al activarse pasa la señal al **elemento transductor**, llamado así porque convierte la señal del receptor activado en otra señal que se dirige hacia un **efector bioquímico** el cual genera otras moléculas que actúan como **segundos mensajeros** los cuales, a su vez, activan a otras proteínas que regulen una función celular específica.

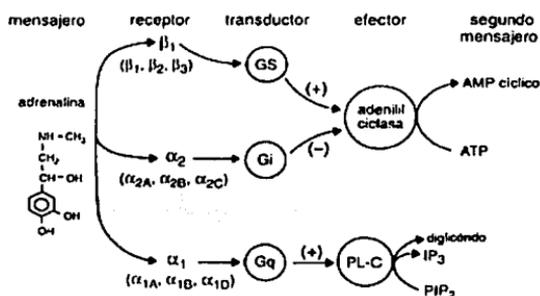


Fig. 2. Elementos de la transducción de una señal, en este caso de la adrenalina y sus diferentes receptores (Tomado de García-Sáinz, 2002).

IV. Receptores celulares.

El concepto de receptor celular tiene una historia de casi 100 años atrás. Fue propuesto en 1906 por J. N. Langley con sus estudios sobre la nicotina y el curare, compuestos que ejercen su acción en los tejidos gracias a lo que él llamó la "sustancia receptiva" (Gammeltoft and Kahn, 1995). Así mismo en 1908 Paul Ehrlich, quien estaba interesado desde 1878 en la utilidad de ciertos colorantes vitales, al observar la especificidad con la que interactuaban con los tejidos, postuló que un fármaco podía tener efecto terapéutico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sólo si tenía "el tipo justo de afinidad". Así, Ehrlich planteó la existencia en los tejidos de "quimiorreceptores" en 1913 y así describe este fenómeno: *Corpora non agunt nisi fixata*, es decir "los agentes no actúan si no se fijan" (García Sáinz, 2002).

Estudios funcionales, farmacológicos y de biología molecular han revelado que los receptores poseen diferente **afinidad** para varios mensajeros, es decir diferente capacidad de asociarse con su ligando (Sitaramayya and Bunnett, 1999).

Los receptores celulares tienen dos características esenciales: 1) **especificidad** para reconocer al mensajero e interactuar con él y 2) **activar** la secuencia de eventos que llevan a la respuesta celular ante ese estímulo. Cuando el ligando (sea un agonista, un antagonista o un agonista inverso) es reconocido por el receptor, se acoplan y este último cambia de conformación y permanece así hasta que se separa del ligando. Este fenómeno es importante en la transmisión de la señal hormonal (García Sáinz, 2002).

Los receptores son proteínas generalmente de alto peso molecular y estructura variable. Para poder entender mejor su funcionamiento pueden dividirse según su localización en la célula en dos grandes grupos: los **intracelulares** y los que están en la membrana celular o bien **transmembranales**.

Los **intracelulares** son receptores en el citoplasma o en el núcleo celular. Sus agonistas son moléculas pequeñas que atraviesan la membrana plasmática (hidrofóbicas). Algunos ejemplos de ligandos que activan a estos receptores están los glucocorticoides (cortisol y cortisona), hormonas sexuales (masculinas y femeninas, andrógenos y estrógenos respectivamente), hormonas tiroideas, etc. (García Sáinz, 2002; Voet and Voet, 1996). Recientemente a algunos miembros de este grupo se les ha considerado como "Factores Accesorios de la Transcripción", como por ejemplo el receptor para estrógenos, que son capaces de modular la transcripción de genes (Simoncini *et al.*, 2000).

Los **receptores transmembranales** son proteínas embebidas en la membrana de la célula. Incluyen un gran número de receptores, pero para su mejor comprensión se han clasificado por su estructura y función en 3 familias:

1. Receptores-canal
2. Receptores con actividad enzimática o asociada a enzimas
3. Receptores acoplados a proteínas G

1. Receptores-canal, activados por ligando o ionotrópicos: llamados así porque forman canales en la membrana celular que permiten el paso de iones al interior y son activados por una hormona o neurotransmisor. Entre ellos se encuentran los colinérgicos y nicotínicos (activados por acetilcolina), el del Ácido Gamma Amino Butírico tipo A (GABA_A), los de glicina y glutamato. Estructuralmente poseen 5 subunidades que atraviesan la membrana formando una roseta con una depresión central que constituye el canal. Cada subunidad está formada de un extremo amino en el exterior de la célula. Tiene 4 dominios transmembranales (es decir está embebida en la membrana de forma tal que la atraviesa 4 veces) unidos por 2 asas intracelulares y una extracelular. Su extremo carboxilo también es extracelular. Esta estructura es la que define a esta familia. El ligando opera la apertura o cierre del canal acoplándose entre dos de las 5 subunidades. Estos canales se encargan de controlar el balance electroquímico a ambos lados de la membrana al regular el paso de iones como cloro o sodio con gran selectividad. Permiten así la comunicación eléctrica entre neuronas y con células musculares (Gammeltoft and Kahn, 1995; García Sáinz, 2002).

2. Receptores con actividad enzimática o asociados a enzimas: estos receptores pueden interactuar químicamente con otras proteínas y a su vez subdividirse en otras subfamilias:

- A. Receptores con actividad de cinasa
- B. Receptores con actividad de fosfatasa
- C. Receptores con actividad de guanilato ciclasa
- D. Receptores sin actividad catalítica asociados a enzimas

2A. Receptores con actividad de cinasa:

Estos receptores tienen la capacidad de auto-fosforilarse cuando son activados, es decir inducen la fosforilación de receptores de ese mismo tipo. Este proceso de fosforilación (incorporación de moléculas de fosfato) juega un papel muy importante en los procesos de señalización (Doronin *et al.*, 2002). Dentro de los subtipos de receptores en este grupo se encuentran los receptores con actividad de **cinasa de tirosina** y de **cinasa de serina/treonina**. Como ejemplos de los primeros podría mencionarse a los receptores para insulina, para el Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor o EGF) y para el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (Platelet Derived Growth Factor o PDGF). Estos receptores se encuentran

en la membrana, aunque en el caso de los receptores para el EGF también se sabe que se encuentran en el núcleo celular y están fuertemente relacionados con las actividades proliferativas de la célula (Lin *et al.*, 2001).

2B. Receptores con actividad de fosfatasa: estos receptores hidrolizan el fosfato unido a los residuos de serina/treonina y tirosina de proteínas previamente fosforiladas. Hay receptores con actividad de fosfatasa en residuos fosforilados de tirosina así como de serina/treonina.

2C. Receptores con actividad de guanilato ciclasa: estos receptores tienen actividad enzimática de **guanilato ciclasa (GC)**, la cual forma GMPc (Guanosin Mono-fosfato Cíclico) a partir de la hidrólisis de GTP (Guanosin Tri-fosfato). Existen varias formas de esta enzima, unas **GC solubles** que se hallan en el citoplasma y otras **GC asociadas a la membrana**. La GC mejor estudiada es la que sirve como receptor para los factores natriuréticos que secreta el corazón (péptidos que favorecen la eliminación del sodio vía urinaria, regulando el volumen de la orina y la presión sanguínea). Las GC solubles se encuentran en el citoplasma y son activadas por el óxido nítrico (NO) que se sintetiza en el endotelio arterial (García Sáinz, 2002; Sitaramayya and Bunnnett, 1999).

2D. Receptores sin actividad catalítica asociados a enzimas: no poseen actividad enzimática intrínseca sino que se asocian a otras enzimas en el citoplasma (generalmente cinasas) para transmitir su señal, por ejemplo los receptores para citocinas como las interleucinas, las cuales activan células del sistema inmune como los monocitos y los receptores para interferón gamma (IF γ) (producido por linfocitos ante estímulos inmunológicos). Estos receptores están formados al menos por dos subunidades y al ser activados por su agonista se dimerizan, activando posteriormente a las cinasas intracelulares que transmiten el estímulo a otras partes de la célula.

3. Receptores acoplados a proteínas G: este nombre lo reciben debido a que interactúan con componentes intermediarias llamadas "proteínas G". Esta familia incluye a la rodopsina (receptor de la luz en el ojo de los vertebrados), al receptor de la adrenalina (epinefrina), del ácido lisofosfatídico (LPA), de la histamina, serotonina, dopamina,

vasopresina, opioides, prostanoïdes, entre muchos otros. Enseguida se detalla sobre estos receptores por ser los que se estudiaron en este trabajo.

V. Receptores acoplados a proteínas G.

Esta es la familia más grande, ubica y versátil de receptores de membrana. Cuenta actualmente con más de 1000 miembros (Oakley *et al.*, 2000) y recientemente han sido estudiados como blanco de medicamentos terapéuticos debido a que participan en un gran número de funciones fisiológicas y en el desarrollo de múltiples patologías. Las estimaciones indican que al menos el 40% de los medicamentos en humanos están dirigidos contra este tipo de receptores (Lu *et al.*, 2002; Chalmers and Behan, 2002) (ver tabla 2).

Tabla 2. Medicamentos dirigidos contra GPCR's.

Receptor blanco	Medicamento	Enfermedad
Histamina	Peppcid	Úlceras
	Claritin	Alergias
Serotonina (5-HT)	Risperdal	Psicosis
	Imitrex	Migraña
	BuSpar	Ansiedad
	Zyprexa	Esquizofrenia
Angiotensina	Cózar	Hipertensión
Adrenérgicos	Toprol-XL	Hipertensión
	Coreg	Congestión cardiaca
	Serevent	Asma
Prostaglandinas	Cytotec	Úlceras
Leucotrienos	Singulair	Asma

Fuente: Chalmers and Behan, 2002.

Los receptores acoplados a proteínas G (abreviados **GPCRs** por su nombre en inglés: G Protein Coupled Receptors) son activados por una gran variedad de estímulos como hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, fosfolípidos, fotones, olores, sabores dulces y amargos, etc. Todos ellos, además de unirse a proteínas G, están embebidos en la membrana plasmática de tal forma que la atraviesan 7 veces, es decir poseen 7 dominios transmembranales, de unos 20 a 25 aminoácidos cada uno (Dohman *et al.*, 1987). Estos dominios, unidos por 3 asas intracelulares y 3 extracelulares, son los sitios de mayor similitud entre los diferentes tipos de GPCRs. Comprenden una familia de más de 800 (Pierce *et al.*, 2002) y otras estimaciones calculan que el 1% del genoma de mamíferos codifica para este tipo de proteínas (Hur and Kim, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

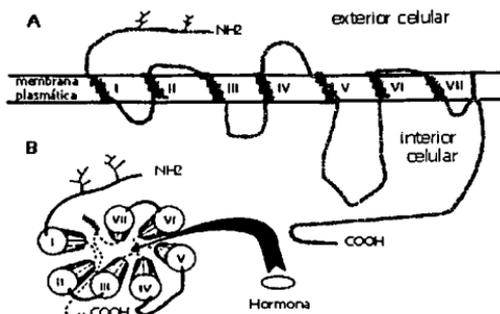


Fig. 3. Modelo de la estructura de receptores acoplados a proteínas G o de siete dominios transmembranales: a) vista transmembranal y b) vista tridimensional desde el exterior celular señalando la zona de interacción de la hormona (Tomado de Gracla-Sáinz, 2002).

Su modelo estructural propone una estructura alfa-helicoidal con su extremo amino extracelular y el extremo carboxilo intracelular. Se tienen dos teorías sobre el sitio de acoplamiento para el ligando: una propone que el ligando se acopla al receptor en una "bolsa de unión para el ligando" formada entre los dominios transmembranales 3, 4 y 6 (TM-III, TM-IV y TM-VI); la otra propone a los TM-II, TM-III y TM-VII. Al dominio TM-III se le ubica en el centro de la estructura del receptor. Los estudios han revelado que tanto la longitud de las asas extracelulares como los aminoácidos que la conforman determinan la especificidad de la unión de los ligandos (Schwartz, 1994).

La clasificación más utilizada para estos receptores los divide en tres familias, A, B y C basándose en la similitud de sus secuencias. Entre los diferentes miembros de las tres familias de GPCRs comparten hasta el 95% de homología entre sus secuencias de aminoácidos (Strader *et al.*, 1994).

La **Familia A** es la más grande, incluye a la subfamilia de receptores para la adrenalina, acetilcolina, dopamina, histamina, serotonina, receptores para olores, angiotensina, bradicinina, endotelina, gonadotropina, cannabinoides y para la luz (la rodopsina, el cual es el único GPCR cuya estructura tridimensional por difracción de rayos X es conocida hasta la fecha (ver Palczewski, *et al.*, 2000)).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La **Familia B** contiene aproximadamente unos 25 miembros, incluyendo a la familia de hormonas gastrointestinales (secretina, glucagon, péptido intestinal vasoactivo y la hormona liberadora de la hormona de crecimiento), la hormona liberadora de corticotropinas, calcitonina y la hormona paratiroidea.

La **Familia C** también es relativamente pequeña y contiene a la familia de receptores metabotrópicos de glutamato, al receptor para GABA_B, los receptores sensores de calcio, así como a los receptores para sabores. Toda esta familia posee un extremo amino extracelular muy grande que parece ser crucial para la unión del ligando y, por lo tanto, para la activación del receptor.

Los GPCRs transmiten el estímulo ambiental mediante las proteínas G, por lo que estas constituyen el elemento transductor en este sistema de comunicación. Estas proteínas fueron estudiadas inicialmente por el Dr. Martin Rodbell (ver Rodbell *et al.*, 1971), en el proceso activación de la adenilato ciclasa (**AC**) (la produce un segundo mensajero intracelular: el **AMPc** o Adenosin Mono-Phosphate Ciclic), mediante GTP. Una proteína era la encargada de activar a la AC uniendo nucleótidos de guanina, a la cual dieron inicialmente el nombre de "proteína N" (por ser una proteína reguladora de Nucleótidos) para después denominarla "proteína G" (por ser nucleótidos de Guanina). El Dr. Rodbell obtuvo el Premio Nóbel de Medicina en 1994, junto con el Dr. Alfred Gilman, por "el descubrimiento de las proteínas G y su participación en la transducción de señales en las células" (García-Sáinz, 2002).

Los GPCRs pueden acoplarse a más de un tipo de proteína G, dependiendo del tipo de estímulo que reciba la célula. Muchos de estos receptores comparten vías de señalización que son activadas con diferentes grados de eficiencia por una hormona en particular. La señal intracelular iniciada por un agonista y la fuerza de propagación de esta señal dependerá del número y tipo de receptores, de transductores (proteínas G) y de efectores (Birbaumer, 1992; Hepler and Gilman, 1991; Lomasney *et al.*, 1991).

VI. PROTEÍNAS G.

Como ya se ha visto, son esenciales en la transmisión de la señal y en particular en la especificidad de ésta. Mediante su purificación se sabe que están conformadas por un heterotrímero, es decir por tres subunidades distintas, la subunidad alfa (α) que pesa entre 40 y 43 kDa, la subunidad beta (β) de 35 kDa y la gamma (γ) de 14 kDa. Actualmente, con el proyecto de secuenciación del genoma humano casi completo, se

han identificado 27 subunidades G α , 5 subunidades G β y 14 subunidades G γ (Albert and Robillard, 2002). Se conocen 4 familias de proteínas G, clasificadas con base en la secuencia de residuos de aminoácidos de la subunidad alfa: G s , G vo , G $q/11$ y G $12/13$ (Gilman, 1987; Hur and Kim, 2002).

Las proteínas G regulan a otras proteínas efectoras o amplificadoras. Las proteínas G s (s="stimulation") activan a la adenilato ciclasa, mientras que las G i (i="inhibition") la inhiben. La estimulación de G q activa a la fosfolipasa C (PLC) y canales de calcio. Las G 12 están implicadas en la regulación de otro grupo de proteínas G denominadas "proteínas G pequeñas" o "de bajo peso molecular" (20-30 kDa) donde están incluidas las familias Ras, Rho, Rab y Ran que regulan procesos como la expresión génica, organización del citoesqueleto, tráfico de vesículas y otros procesos en diferentes fases del ciclo celular (Matozaki *et al.*, 2000). Varios estudios han mostrado que hay mayor preferencia específica de GPCR's por las G s , G vo y G $q/11$, que por G $12/13$, (Hur and Kim, 2002).

Hay que señalar el hecho de que los GPCR's pueden acoplarse a varios tipos de proteínas G, a unas con mayor afinidad que a otras según el estímulo, pero imponiendo mayor especificidad en la respuesta, y en la selección de la proteína G, los dominios intracelulares del receptor juegan un papel muy importante, así como la subunidad α de la proteína G (Bourne, 1997).

En su estado basal o inactivo una proteína G esta constituida de su subunidad α unida a las otras dos subunidades que forman un dímero fuertemente unido denominado **beta-gamma** ($\beta\gamma$), el cual solo se ha podido separar en condiciones desnaturalizantes. Lo que promueve su activación es la interacción de la proteína G con un receptor activo, aunque se sabe que un receptor en ausencia de su agonista también puede activar a una proteína G aunque en otras condiciones (Gether and Kobilka, 1998).

Estudios sobre la acción de la **toxina de la bacteria del cólera** (*Vibrio cholerae*) mostraron que su efecto sobre las células lo ejerce uniéndose a proteínas tipo G s , modificándolas covalentemente mediante una reacción de ADP-ribosilación en residuos de arginina. La toxina rompe la molécula del NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina) de la célula y une su fracción ADP-ribosa a las proteínas G s (Murayama *et al.*, 1993), manteniéndolas permanentemente activas. En las células de la mucosa intestinal (lugar a donde llega la toxina de la bacteria) las proteínas G s ADP-ribosiladas activan a la AC y se produce AMPc de forma no regulada, lo que impide a las células absorber líquidos del espacio intestinal produciendo así síntomas como la diarrea y la deshidratación. De manera similar la **toxina pertussis** (de la bacteria *Bordetella*

pertussis, causante de la tos ferina) ADP-ribosila a proteínas del tipo G, pero en residuos de cisteína (Sekura *et al.*, 1983; Ul, *et al.*, 1985) y en este caso bloquea su acción inhibitoria sobre la AC. Estas toxinas han sido aprovechados desde hace varios años para estudiar y caracterizar la participación de proteínas G (Neer, 1995).

Ciclo de activación de las proteínas G.

En su estado basal o inactivo las proteínas G tienen unida una molécula de GDP (Guanosin Di-fosfato) en su subunidad α . El cambio conformacional que sufre el receptor activado por su agonista promueve en la proteína G el intercambio de GDP por GTP, lo cual lleva a su activación. Las subunidades de la proteína G se disocian en dos partes, la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$. Aquí las proteínas G, en su papel de transductoras, llevan la señal a las proteínas efectoras (como la AC o la fosfolipasa C), las cuales generan **segundos mensajeros** que se encargarán de llevar la señal a otras partes de la célula. Esto se ve favorecido mientras la subunidad α está activada con GTP. La subunidad α posee actividad catalítica de GTPasa, es decir tiene la capacidad de hidrolizar el GTP a GDP. Esta reacción lleva a la inactivación de la subunidad α , reestableciendo su unión con el dímero $\beta\gamma$ y queda lista para un subsecuente ciclo de activación. De esta manera, la hidrólisis del GTP es un mecanismo de control de la duración del estado activo de la proteína convirtiéndose un punto importante de regulación de la respuesta al estímulo ya que la velocidad de hidrólisis del GTP varía de un tipo de subunidad α a otro (Carty *et al.*, 1990; Linder *et al.*, 1990).

La **subunidad α** tiene varios dominios, uno en donde radica la actividad de GTPasa, en el cual está tanto el dominio de unión a los nucleótidos de guanina (GDP y GTP) como el de unión al receptor y el de unión para el dímero $\beta\gamma$. Otro dominio es una región en forma de α -hélice que, junto con el dominio de GTPasa, contribuye a la unión de la subunidad α con las proteínas efectoras (Gilman, 1987).

El **dímero $\beta\gamma$** es un complejo proteico sin actividad enzimática intrínseca, sin embargo se le considera una unidad funcional ya que se le han atribuido acciones importantes en el proceso de la transducción de la señal y también se les ha considerado como elemento crucial para la especificidad entre los receptores y los efectores (Vanderbeld, 2000). Se le ha asociado con la activación (Chen *et al.* 1995) e inhibición (Tang and Gilman, 1991) de algunos tipos de AC, con la activación de la fosfolipasa C- β 3 (Carozzi *et al.*, 1993), con la

activación de algunos canales de calcio (Kim *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1993), con la activación de proteínas cinasas como la fosfatidilinositol-3 cinasa (Morris *et al.*, 1995), las cinasas específicas para los GPCRs (**GRKs**) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Luttrell *et al.*, 1996). Incluso el dímero $\beta\gamma$ participa en la regulación cruzada entre receptores acoplados a proteínas G de diferente tipo (Quitterer and Lohse, 1999).

VII. Vías de transducción de los GPCRs.

Una de las principales funciones de las proteínas G es servir como enlace funcional entre los receptores y los efectores. Dentro de estos últimos, los más importantes descritos hasta la fecha son los sistemas de la Adenilato Ciclasa (AC) y de la Fosfolipasa C (PLC), aunque existen otros también activados por proteínas G y pueden verse resumidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Efectores de proteínas G heterotriméricas.

Subunidades de proteínas G	Efectores
G α G α_{olf} (sistema olfatorio)	↑ Adenilato Ciclasa (AC) Canales de calcio Cinasas de la familia C-Src
G α_T (Transducina) G α_{Gust} (Gustducina)	↑ Fosfodiesterasa de GMPc Fosfodiesterasa (detección de los sabores dulce y amargo)
G $\alpha_{1, 2, 3}$ G α_2	↓ AC, ↑ cinasas de la familia c-Src Rap1, Gap1
G α_q , G α_{11} , G $\alpha_{14, 15, 16}$	↑ Fosfolipasa C (PLC), RhoGEF Proteína cinasa C (PKC)
G α_{12} , G α_{13}	P115RhoGEF, formación de fibras de stress, E-caderina
G $\beta\gamma$	Canales de potasio (GIRK) GRKs ↑ AC II y AC IV ↑ PLC- β 1, β 2 y β 3 PI3K γ

↑=activación; ↓=inhibición.

Tomado de Pierce *et al.*, 2002.

Las diferentes subunidades de las proteínas G, al compartir algunos efectores, pueden añadir especificidad en la respuesta por parte de los receptores según el estímulo recibido (la Transducina es la proteína G específica del sistema visual y la Gustducina es su análogo en la percepción de sabores).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sistema de la Adenilato Ciclasa (AC).

Esta proteína efectora es la encargada de sintetizar AMPc o Adenosín Mono-fosfato cíclico (un segundo mensajero muy importante) a partir de la hidrólisis de ATP. El Dr. Earl Sutherland fue el pionero en los estudios de esta enzima, la cual aisló y caracterizó junto con la fosfodiesterasa (enzima que degrada al AMPc). Al identificar al AMPc se pudo considerar su participación en el efecto hormonal sobre las células. Por estos trabajos le otorgaron el Premio Nóbel de Medicina en 1971.

Las AC son una familia de enzimas asociadas a la membrana plasmática de la cual se han identificado al menos 9 isoformas cuyos pesos moleculares van entre 200 y 250 kDa. Pueden dividirse en 4 familias con distintos patrones de regulación, ya sea por $G\alpha$ o por el dímero $G\beta\gamma$, por la proteína cinasa C (PKC) o calcio (Mons *et al.*, 1998). Su distribución en tejidos es muy variada y su estructura comprende dos dominios hidrofílicos extracelulares y dos hidrofóbicos intracelulares alternados en la membrana plasmática (Krupinsky *et al.*, 1992).

Cuando una proteína G se activa, su subunidad $G\alpha$ con GTP puede unirse a la AC. Según el tipo de subunidad α , si es $G\alpha_s$ o $G\alpha_i$, la AC se activará o se inhibirá respectivamente. Cuando la AC se activa, su subunidad catalítica convierte al ATP en 3' 5' AMP cíclico (AMPc). Esta molécula puede activar mediante un cambio conformacional a una proteína cinasa dependiente de AMPc, denominada **PKA** (por Protein Kinase cAMP-dependent). Esta enzima posee dos subunidades catalíticas y dos reguladoras que se separan al activarse las primeras, las cuales pueden fosforilar a otras proteínas en sitios específicos de serina y treonina, resultando en la regulación de la transducción de la señal (Habener, 1995). Si es la subunidad $G\alpha_i$ la que se une a la AC, la hidrólisis de ATP no ocurre y por lo tanto tampoco la síntesis de AMPc.

Otra forma de regular las acciones del AMPc es mediante su degradación a través de la fosfodiesterasa, la cual convierte al 3' 5' AMP (AMPc) en 5' AMP, haciéndolo lineal (no cíclico) inhibiendo su acción sobre la PKA (Tang and Gilman, 1992).

Entre los receptores que se acoplan a la vía activadora de la AC ($G\alpha_s$) están aquellos para vasopresina, glucagon y la hormona luteinizante, mientras que en la vía inhibidora ($G\alpha_i$) se acoplan algunos receptores para la acetilcolina. Sin embargo puede ocurrir que haya receptores de la misma subfamilia que se acoplen a una y otra vía, tal es el caso de los receptores adrenérgicos β_1 , β_2 y β_3 a $G\alpha_s$ y de los α_2 a $G\alpha_i$ (Lefkowitz and Caron, 1988). Evidencia experimental reciente en el receptor β_2 -adrenérgico apoya la idea de que existe un intercambio de afinidades o "switching" hacia $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$ mediada por PKA

que regula la actividad de la AC (Daaka *et al.*, 1997; Liggett *et al.*, 1991; Zamah *et al.*, 2002).

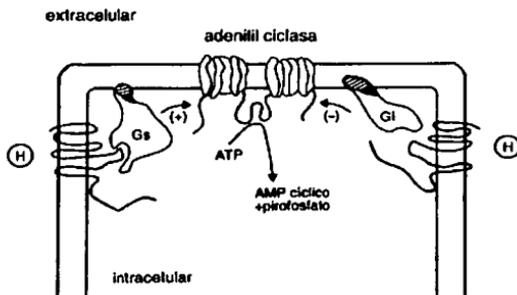


Fig. 4. Sistema de la Adenilato Ciclasa, regulada por proteínas Gi y Gs mostrando su actividad activadora (+) o inhibitoria (-) (Tomado de García-Sáinz, 2002).

Sistema de Fosfoinosítidos-Calcio.

Los fosfoinosítidos (PPI) son fosfolípidos que contienen en su estructura un carbohidrato (el *myo*-inositol) como cabeza polar. Estos fosfolípidos fueron estudiados inicialmente por los Dres. Hokin y Hokin en 1953 y descubrieron que participaban en la respuesta del páncreas ante la estimulación hormonal (Hokin and Hokin, 1953). Las moléculas producto de la hidrólisis de los PPI son segundos mensajeros de amplia distribución celular. El fosfoinosítido hidrolizado en primer lugar por la Fosfolipasa C (PLC) es el 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂ ó PIP₂), el cual se encuentra asociado a la membrana, cuya hidrólisis produce dos moléculas que sirven como los segundos mensajeros principales, el inositol-1,4,5-trisfosfato (I-1,4,5-P₃ ó PIP₃) y el 1, 2-diacilglicerol (1,2-DAG ó DAG).

Las PLC específicas para fosfoinosítidos (PPI-PLC) son una subfamilia que actúa específicamente sobre los lípidos que contienen inositol, como la fosfatidil-colina. Se dividen en tres tipos, PLC- β , PLC- γ (~ 150 kDa) y PLC- δ (~85 kDa) y son proteínas con poca identidad en sus secuencias. El grado de identidad es mucho mayor dentro de los subtipos, por ejemplo los β 1, β 2 y β 3 de la PLC- β . Así mismo para las PLC- γ existen las γ 1 y γ 2, mientras que para la PLC- δ están incluidas las δ 1, δ 2 y δ 3. Todas hidrolizan

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

específicamente al PIP_2 . Solamente la $\text{PLC-}\beta$ y la $\text{PLC-}\delta$ son activadas por GPCRs, ya que la $\text{PLC-}\gamma$ se acopla directamente a receptores con actividad de cinasa de tirosina.

El ciclo de los fosfatos de inositol comienza cuando un receptor activa a una proteína G_q , la cual es capaz de activar a la PLC (aunque también puede ser activada por proteínas G sensibles a toxina *pertussis*). Esta enzima es parte de una familia de fosfolipasas que hidrolizan fosfolípidos en la posición 3 del enlace fosfodiéster de su armazón de glicerol. Cuando el PIP_2 es el sustrato de la enzima, la PLC lo convierte en IP_3 y en DAG. El IP_3 puede difundir fácilmente en el citoplasma y activa receptores tipo canal que se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico (proteínas homotetraméricas de gran tamaño, ~250,000 kDa), lo que genera la salida de iones de calcio (Ca^{2+}) de este depósito. Una vez en el citosol, el calcio puede actuar también como segundo mensajero y activar a un gran número de enzimas.

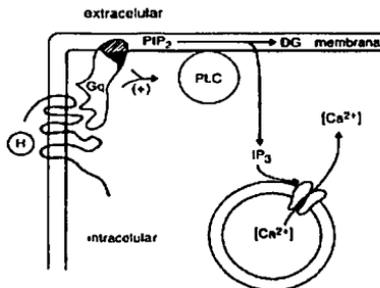


Fig. 5. Sistema de Fosfoinosítidos-Calcio, mediante la PLC activada por proteínas G_q . Se muestra la producción de DAG e IP_3 , y la liberación inducida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (Tomado de García-Sáinz, 2002).

La concentración de calcio intracelular es regulada por ATPasas de calcio en la membrana que lo llevan hacia el exterior de la célula, así como por su secuestro por parte del retículo endoplásmico y otros organelos como las mitocondrias. La concentración de IP_3 también es regulada por su degradación por parte de fosfatasa hacia mioinositol-1,4-bisfosfato (IP_2), mioinositol-1-fosfato (IP) y mioinositol (Berridge *et al.*, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una de las proteínas más importantes activada en esta vía es la **Proteína Cinasa C** (o **PKC** por Protein Kinase Calcium-dependent), activada por calcio, DAG o fosfatidil-serina, y regula a otras proteínas mediante fosforilación.

La familia de enzimas PKC (~67 a 83 kDa) son codificadas al menos por 10 genes cuyos procesos de transcripción alternativos ("splicing") puede originar formas más complejas de esta proteína (Asaoka *et al.*, 1994). Sus 11 isoformas conocidas se han dividido en 3 familias según su estructura y su cofactor de regulación, las Clásicas o Convencionales (PKC- α , β 1, β 2 y γ), las Nuevas (PKC- δ , ϵ , η , θ y μ) y las Atípicas (PKC- ξ y λ) (Newton, 1995). Todos los subtipos requieren para activarse de fosfatidilserina, pero muestran diferentes requerimientos de calcio. Las PKC clásicas son activadas por calcio y DAG, reforzando su activación con ácidos grasos *cis*-insaturados como el oleico, linoleico y araquidónico. Las isoformas Nuevas son insensibles a calcio pero responden a ésteres de forbol y las Atípicas tampoco responden ante calcio, DAG o ésteres de forbol pero sí ante fosfatidilserina (Newton, 1995).

La PKC fosforila a proteínas en sitios de serina y treonina, participando así en la mediación de las respuestas a neurotransmisores u hormonas que activen la vía de fosfolinosítidos, y puede participar en actividades de ATPasa y fosfatasa (Newton, 1995). Dentro de las funciones en que se le involucra la PKC están la desensibilización de receptores, la modulación de cambios estructurales de la membrana, la regulación de la transcripción, mediación de respuestas inmunes, crecimiento celular, en procesos de aprendizaje y memoria entre otros. Los ésteres de forbol, como el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA por 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), que son potentes promotores de tumores, pueden simular la actividad del DAG y activar a la PKC de manera prolongada ya que no son fácilmente metabolizados, por lo que se utilizan ampliamente en el estudio de las vías de recambio de PPI y de la participación de la PKC en diferentes vías de transducción, ya que la activan directamente atravesando la membrana plasmática sin la participación de receptores (Newton, 1995).

VIII. Mecanismos de regulación de los GPCRs.

Cuando un receptor es activado, su regulación es importante para que la célula pueda dar una respuesta global adecuada ante los estímulos que recibe. Si un receptor permaneciera constantemente activo respondiendo sin control ante el estímulo, sería un problema mas para la célula y el organismo entero. Por ejemplo la rodopsina, el receptor para la luz en nuestro sistema visual, sufre de un proceso de regulación llamado

desensibilización que ocurre a menos de 1 segundo de haber sido estimulada, de otro modo la estimulación visual sería percibida como destellos constantes de luz, sin poder distinguir una imagen de otra.

La desensibilización puede clasificarse según varios criterios: si es causada específicamente por el agonista (llamada "**desensibilización homóloga**") o por otro ligando ("**heteróloga**") según la naturaleza del estímulo; si es rápida (ocurre en minutos o segundos) o lento (horas a días) y si es por la pérdida de la funcionalidad del receptor (desacoplamiento) o bien por la disminución en el número de receptores en la membrana ("**down-regulation**").

En general para que los receptores puedan responder ante cambios rápidos en la concentración de su agonista, deben sufrir de un ciclo de inactivación y restauración. Mas adelante se detallarán estos últimos mecanismos ya que son importantes para la comprensión del funcionamiento de los GPCRs. En el caso de los GPCRs se involucran diversos procesos celulares como la internalización, la modulación de su acoplamiento a proteínas G, reciclamiento hacia la membrana plasmática, degradación y la regulación de su expresión (Lefkowitz *et al.*, 1998). Evidencia reciente también señala que los GPCRs pueden formar heterodímeros, ya sea entre receptores de la misma familia o bien de una distinta. Se cree que esto permite que la activación del receptor por su ligando afecte la afinidad de otros receptores por sus ligandos. Otra teoría es que esto provoca una redistribución de las proteínas G, lo que las hace interactuar con otros receptores (Cordeaux and Hill, 2002).

A) Desensibilización.

Se ha definido como la regulación aguda de los receptores, en especial para los GPCRs, caracterizada por el debilitamiento de su respuesta a su estimulación en presencia continua del agonista. También se le ha llamado desactivación, adaptación, tolerancia, apagado o taquifilaxis (Krupnick and Benovic, 1998). Los mejores modelos de estudio de este proceso han sido la desensibilización de la rodopsina a la luz (Hargrave and McDowell, 1992) y del receptor β_2 -adrenérgico a su agonista (Hausdorff *et al.*, 1990), aunque también se ha estudiado extensamente en el efecto de otras hormonas.

El proceso general de desensibilización involucra varios mecanismos, principalmente el desacoplamiento del receptor con la proteína G en respuesta a su fosforilación del receptor (Bouvier *et al.*, 1988), la internalización de los receptores de la membrana hacia compartimentos intracelulares (Anborgh *et al.*, 2000) y el proceso de "**down-regulation**"

(disminución del número total de receptores a partir de su baja síntesis), así como por la degradación de receptores por parte del aparato lisosomal de la célula (Jockers *et al.*, 1999) y los lapsos de tiempo en los cuales ocurre este proceso varían desde segundos (en el caso de la fosforilación) hasta horas (en el caso de la "down-regulation") (Ferguson, 2001). Más adelante se detalla el proceso de fosforilación ya que se ha establecido como el evento inicial para que ocurra la desensibilización de un GPCR (Chen *et al.*, 1995; Lohse *et al.*, 1992; Vázquez-Prado *et al.*, 2000).

Desensibilización homóloga.

El fenómeno es detectado como una disminución de la respuesta ante el estímulo constante y puede medirse mediante la fosforilación propia del receptor o bien por la actividad de proteínas efectoras. Esta regulación negativa de la respuesta es específica para la hormona con la que se ha estimulado de forma crónica. Cuando un agonista activa a su receptor, le provoca un cambio conformacional que lo lleva a su acoplamiento con la proteína G correspondiente y deja expuestos los sitios específicos para fosforilación por las GRKs (quinasas de GPCRs). Sin embargo, esta fosforilación no es el único fenómeno necesario para inactivar totalmente al receptor. Esto requiere de un componente adicional, proteínas denominadas "arrestinas", hacia las cuales el receptor muestra una alta afinidad mientras permanece en el estado fosforilado y cuya acción mecánica es desacoplar al GPCR de la proteína G (Ferguson, 2001).

Arrestinas y la desensibilización homóloga.

Se identificaron mediante estudios sobre los bastones en la retina donde se descubrió una proteína de 48 kDa que se acoplaba a la rodopsina activada por la luz (Pfister, 1985) a la cual actualmente se le llama "arrestina visual". Se conocen 4 tipos de arrestinas cuyas propiedades se resumen en la tabla 4. Pueden subdividirse en dos grupos basados en la homología de sus secuencias, función y distribución en los tejidos. El primer grupo comprende a las arrestinas visuales (también llamadas antígenos S), que son proteínas en los bastones restringidas a la fototransducción, localizadas principalmente en la retina y glándula pineal. También se ubican a las arrestinas de los conos (arrestina C) que se encuentran distribuidas ampliamente tanto en la glándula pineal como en los conos de la retina. El segundo grupo lo conforman las β -arrestinas (β -arrestina1 y β -arrestina2), expresadas de forma ubicua en la retina pero localizadas predominantemente en tejido

neuronal y en el bazo (Attramadal *et al.*, 1992) y se plantea, aunque aún sin mucha evidencia, la existencia de una tercera familia (Craft *et al.*, 1994).

Además de que las arrestinas contribuyen a la desensibilización de los GPCRs por el desacoplamiento físico entre el receptor y la proteína G (arrestinas visuales), también participan en la internalización de los GPCRs o **endocitosis** (β -arrestinas).

Considerando el número limitado de arrestinas y la gran variabilidad de GPCRs, es probable que la especificidad para cada receptor sea dictada por diferencias discretas en su estructura y por la especificidad del tejido (Ferguson, 2001).

Las arrestinas se unen a GPCRs que han sido fosforilados por GRKs y no por los que han sido fosforilados por cinasas dependientes de segundos mensajeros. Se sabe por ejemplo que el receptor β_2 -adrenérgico aumenta su afinidad de 10 a 30 veces hacia las arrestinas cuando es fosforilado por GRKs (Lohse, 1992).

Tabla 4. Propiedades de las Arrestinas.

Familia	Tamaño (a. a.)	Distribución en los tejidos	Sustratos	Fosforilación	Función
Arrestina visual	404	Retina, pineal, Cerebelo.	Rho, β_2 AR, m2, mAChR	PKC, Ca ²⁺ , calmodulina	Desensib.
Arrestina de los Conos (C-arrestina)	388	Pineal, pulmón gl. Pituitaria.	No determ.	No determ.	Desensib.
β -arrestina1	418	Cerebro, bazo hipocampo, ovarios, corazón, pulmón, músculo	β_2 AR, m2, mAChR Rho	MAPK	Desensib. Endocitosis Señalizar.
β -arrestina2 (Arrestina 3)	410	Bazo, ovario hipocampo, cerebro, corazón	β_2 AR, m2, mAChR, Rho	Caseína cinasa II	Desens. Endocitosis Señalizar.

AR, receptor adrenérgico; m2, receptor muscarínico; mAChR, receptor Colinérgico; Desensib.; desensibilización
Tomado de Ferguson, 2001.

La capacidad de las arrestinas para diferenciar entre un receptor activado por su propio agonista y uno que es activado por otro ligando distinto indica que poseen un dominio que se une específicamente con las regiones del GPCR que lo señalan como activo. Los primeros estudios sobre esta "región de reconocimiento de activación" (como fue llamada inicialmente) en la rodopsina mostraron que estaban involucradas al menos tres regiones del extremo amino-terminal de la arrestina visual y posteriormente se demostraron otras regiones para las β -arrestinas 1 y 2 (Krupnick and Benovic, 1998). De igual forma, su capacidad para discriminar entre un receptor fosforilado y otro que no lo está recae en un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pequeño dominio que se encuentra también en su extremo amino-terminal, entre los residuos 158 y 185 donde se han identificado varios residuos de aminoácidos básicos esenciales para la interacción con los fosfatos del receptor (Gurevich and Benovic, 1993). Al parecer el extremo carboxilo de las arrestinas participa en la regulación de sus cambios conformacionales, y para las β -arrestinas se conoce un dominio de unión para otra proteína llamada **clatrina**, la cual también participa en la internalización de GPCRs.

El papel de las arrestinas en la desensibilización homóloga ha sido estudiado *in vivo* en los receptores β_1 - (Freedman *et al.*, 1995), β_2 - (Pippig *et al.*, 1993) y α_{1B} -adrenérgicos (Diviani *et al.*, 1996), demostrando que la participación de las GRKs es esencial en la acción de las arrestinas. Estudios más recientes en donde se emplean técnicas como el doble-híbrido y la transfección de células con la proteína verde fluorescente (GFP-Green Fluorescent Protein), han establecido las relaciones de las β -arrestinas con proteínas accesorias como las AP-2 (Adaptor Protein 2, complejos de 4 subunidades: 2 grandes de 100 kDa (α -adaptina y β 2-adaptina), una mediana de 50 kDa (μ 2) y una pequeña de 17 kDa (σ 2) (Kirchhausen, 1999)), que regulan con precisión el proceso de internalización. También se ha estudiado la fosforilación de la β -arrestina2 como modulador de la función de AP-2 en la internalización del receptor β_2 -adrenérgico (Lin *et al.*, 2002).

Internalización de GPCRs.

La internalización o secuestro por endocitosis constituye uno de los procesos más importantes en la regulación de la actividad de los GPCRs activados por su agonista (Koenig and Edwardson, 1997), en donde el número de receptores en la membrana disminuye debido a que son llevados al interior de la célula, dejándolos fuera del alcance de los agonistas. Esta idea se originó con estudios sobre el receptor β -adrenérgico al observarse que se perdían los sitios de unión al agonista en eritrocitos de sapo (ver Chuang and Costa, 1979). Otro estudio mostró que los restos celulares separados en un gradiente de sacarosa y los receptores internalizados se localizaron en fracciones "vesiculares ligeras" mientras que los receptores de superficie estaban en "vesículas pesadas". Al estudiar las proteínas G_s presentes en las vesículas ligeras se encontró que el número era muy reducido o simplemente no existían (Waldo *et al.*, 1983).

Estudios recientes con la GFP han demostrado que la tasa de internalización para cada GPCR es específica para cada receptor. Estas diferencias en la cinética de internalización sugieren que hay múltiples mecanismos de endocitosis o bien que hay

heterogeneidades estructurales entre los receptores que modulan su afinidad relativa por las diferentes proteínas adaptadoras (Ferguson, 2001).

Se ha propuesto que la fosforilación por las GRKs es lo que desencadena los procesos de internalización, sobre todo el papel de la GRK2 en receptores como el de angiotensina (AT₁), el de endotelina (ET_A), el de dopamina (D2) y el β_2 -adrenérgico. La teoría actual es que la fosforilación estabiliza al receptor en una conformación tal que promueve su interacción con otros elementos celulares que llevan a la internalización, por lo tanto, el proceso dependerá del nivel de expresión de las β -arrestinas, del tipo de GPCR y su expresión, de la fosforilación por GRKs, del sistema hormonal y el contexto celular (Ferguson, 2001).

Cuando un GPCR es activado, las β -arrestinas, que normalmente se encuentran en el citosol, se translocan hacia la membrana para unirse al receptor y promueven la asociación de moléculas de clatrina para formar una vesícula cubierta de clatrina en la membrana que poco a poco se va invaginando hasta que se separa de la membrana y se convierte en una vesícula intracelular (von Zastrow and Kobilka, 1994).

Por acción de otra proteína, la **dinamina**, que es una GTPasa co-localizada con la clatrina capaz de unirse a fosfoinosítidos por su dominio PH (Pleckstrin-Homology) en su amino-terminal, esencial para la formación de las vesículas cubiertas de clatrina y cataliza la fusión de la vesículas en formación en la membrana (Claing *et al.*, 2002). La inhibición de esta proteína bloquea la internalización del receptor β_2 -adrenérgico (Zhang *et al.*, 1996).

Actualmente se conocen otros procesos de internalización alternativos, particularmente en el receptor de angiotensina AT_{1A} y el muscarínico m2, en donde el bloqueo o la baja expresión de GRKs y β -arrestinas (en el caso del AT_{1A}) o β -arrestinas y dinamina (en el caso del m2), no bloquean su internalización inducida por su agonista (Ferguson, 2001).

Estos procesos no se conocen del todo, aunque se sabe que participan invaginaciones endógenas preformadas en la membrana llamadas **caveolas** (formadas de la proteína caveolina) que secuestran a los receptores activados, así como la participación de otras vesículas sin clatrina y dinamina (Büneman *et al.*, 1999). También se sabe que la internalización de los GPCRs activa vías de señalización independientes de proteínas G.

En la **desensibilización por internalización** puede ocurrir que los GPCRs, una vez internalizados, no sean devueltos o reciclados a la membrana, evitando que sean estimulados otra vez o debilitando la señal que transmitieron inicialmente (Oakley *et al.*, 1999). En algunos casos son llevados hacia el aparato lisosomal de la célula para ser degradados (Trejo and Coughlin, 1999) y en otros casos mas bien permanecen

secuestrados en endosomas (Anborng, 2000). La importancia fisiológica de este proceso es mantener la homeostasis normal de la célula o tejido ante una estimulación crónica. Sin embargo, así como este mecanismo protege a la célula de la constante estimulación, el permanecer mucho tiempo en estas condiciones puede ser dañino, por lo tanto debe haber un mecanismo de **resensibilización**.

Este mecanismo se sabe que es logrado por la actividad de proteínas fosfatasas que desfosforilan a los receptores que ya han sido fosforilados e internalizados y son reciclados a la membrana para estar expuestos a otro estímulo. Al parecer la **resensibilización en general tarda mas que la desensibilización (segundos o pocos minutos)**, por lo que es menos eficiente (Gros *et al.*, 1997). Estudios con el receptor $\alpha_1\beta$ -adrenérgico muestran cómo después de haber sido activado y desensibilizado, es reactivados y reciclado continuamente a la membrana aún durante la exposición a su agonista (Fonseca *et al.*, 1995).

Para que un GPCR sea resensibilizado requiere que las β -arrestinas sigan unidas a él dentro del endosoma cubierto de clatrina en el cual fue internalizado (Ferguson *et al.*, 1998), pero principalmente que sea desfosforilado por las fosfatasas específicas para GPCRs y señalado por esta condición es reciclado hacia la membrana. Si los receptores han sido degradados, la resensibilización depende de la síntesis *de novo* del receptor o bien de una reserva intracelular de receptores "vírgenes" que puedan reemplazar a los receptores degradados (Shapiro and Coughlin 1998).

Desensibilización heteróloga.

Este proceso ocurre cuando un receptor es desensibilizado en respuesta a un agonista distinto pero que igualmente lleva a su fosforilación, lo cual puede ocurrir entre receptores de la misma familia de GPCRs o bien de familias diferentes (Cordeaux and Hill, 2002).

Este tipo de desensibilización está mediado por cinasas dependientes de segundos mensajeros como la proteína cinasa A (PKA), activada por receptores acoplados a proteínas G_s y la proteína cinasa C (PKC), activada por receptores acoplados a proteínas G_q . Estudios con el β_2 -adrenérgico muestran como su fosforilación mediada por estas cinasas disminuyen su capacidad para activar proteínas G (Pitcher *et al.*, 1992). Actualmente se sabe que tanto la PKA como la PKC provocan una desensibilización en los GPCRs mediante su fosforilación en sitios diferentes a los que fosforilan las GRKs (Lefkowitz *et al.*, 1990). En particular, la PKC desensibiliza de forma heteróloga a varios

GPCRs como el de angiotensina AT1 (Daaka *et al.*, 1998) y el α_{1b} -adrenérgico (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Casas-González *et al.*, 2000).

B) Fosforilación; cinasas que participan en la fosforilación de GPCRs.

La fosforilación (unión covalente de grupos fosfato, PO_4^{2-}) puede producir cambios en la actividad de una molécula. Es uno de los mecanismos de regulación más importantes que existen a escala molecular y participa prácticamente en todas las funciones de la célula: la regulación del metabolismo, la contracción muscular, secreción, proliferación celular, diferenciación, motilidad celular, transcripción de genes, síntesis de proteínas, liberación de hormonas y señales nerviosas entre otras de igual importancia. Los estudios y el planteamiento de la fosforilación reversible en las proteínas como mecanismo de regulación biológica llevados a cabo por los doctores E. H. Fisher y E. G. Krebs les valió el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1992.

Se sabe que la fosforilación por cinasas intracelulares es la forma más rápida de desensibilización de los GPCRs (Ferguson, 2001), lo que lleva al desacoplamiento del receptor con la proteína G (Jewell-Motz *et al.*, 2000). Dentro de las proteínas cinasas que regulan a los GPCRs hay 3 grupos principales:

- 1) Cinasas activadas por segundos mensajeros, como la Proteína Cinasa A (PKA) y la Proteína Cinasa C (PKC) (Clark *et al.*, 1988; Houslay, 1991).
- 2) Algunos miembros de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G o **GRKs** (por su nombre en inglés G protein-coupled Receptors Kinases) (Ferguson *et al.*, 1998; Krupnick and Benovic, 1998) y
- 3) Algunos receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (Haddock *et al.*, 1992)

1) Cinasas activadas por segundos mensajeros.

Cinasas como la PKA y la PKC fosforilan a otras proteínas transfiriéndoles el grupo γ -fosfato del ATP a sus residuos de serina y treonina (generalmente sitios consenso). Como su nombre lo indica, son activadas por segundos mensajeros como al AMPc, calcio y DAG. La activación de la PKC produce la fosforilación y desensibilización de receptores acoplados a proteínas G_i y G_q (Diviani *et al.*, 1997). Esas cinasas fosforilan indistintamente tanto a receptores activados por su agonista como a los que no lo son (Lohse, 1990b). También se sabe que algunos subtipos de estas cinasas, en especial las

PKC α , ζ y δ , son activadas al ser fosforiladas por la cinasa dependientes de fosfoinosítidos 1 o PDK1 (por Phosphoinositide Dependent Kinase) (Sonnenburg *et al.*, 2001) así como por PIP₃, ambos procesos dependientes de PI3K (Le Good *et al.*, 1998).

2) GRKs, cinasas de los receptores acoplados a proteínas G.

Se identificaron gracias a estudios sobre desensibilización de la rodopsina y del receptor β_2 -adrenérgico. Comprenden una familia de siete miembros (GRK1-GRK7) de cinasas de residuos de serina y treonina que con un grado significativo de homología en sus secuencias. Se han identificado siete genes para estas proteínas en mamíferos y algunos sufren de "splicing" alternativo para dar lugar a otras isoformas (Premont *et al.*, 1995). La organización de cada GRK consta de un dominio central catalítico, un dominio amino-terminal que tal vez participa en el reconocimiento del sustrato y que contiene un dominio tipo RGS (por su nombre en inglés "Regulator of G protein Signaling" o Regulador de la Señalización de Proteínas G), lo cual sugiere que además de regular la respuesta de los GPCRs también regulan proteínas G (Carman *et al.*, 1999). Su dominio carboxilo-terminal ayuda a la GRK a unirse a la membrana. Su especificidad *in vitro* no es del todo conocida, pero se sabe que su distribución en diferentes tejidos y su nivel de expresión contribuyen en su regulación *in vivo* (Claing *et al.*, 2002).

Según el grado de homología en sus secuencias de aminoácidos y su similitud funcional las GRKs se han agrupado en: 1) GRK1 (cinasa de la rodopsina) (Lorenz *et al.*, 1991) y GRK7 (probable cinasa de la opsina en los conos) (Weiss, *et al.*, 1998), 2) GRK2 (también conocida como β ARK1 por β -Adrenergic Receptor Kinase 1 ó bien cinasa 1 del receptor β -adrenérgico) (Benovic *et al.*, 1989) y GRK3 (β ARK2) (Benovic *et al.*, 1991) y 3) las GRK4, una subfamilia de 3 miembros: GRK4-IT11 (Ambrose *et al.*, 1992), GRK5 (Kunapuli and Benovic, 1993) y la GRK6 (Benovic and Gomez, 1993). En la Tabla 5 se muestran las características de la familia de las GRKs.

Modificaciones covalentes post-traduccionales reversibles en las GRKs como la farnesilación (en GRK1) y la palmitoilación (GRK4 y GRK6) son importantes en su regulación, así como la unión con el dímero G $\beta\gamma$ con GRK2 y GRK3. Al parecer las funciones de GRK5 son reguladas por procesos de autofosforilación y su unión con fosfolípidos de membrana (Ferguson, 2001).

Las GRKs fosforilan en residuos de serina y treonina, ya sea en el extremo carboxilo de los GPCRs como el β_2 -adrenérgico y la rodopsina o bien en la tercera asa intracelular en el caso del receptor muscarínico m2 y del α_2 -adrenérgico (Krupnick and Benovic, 1998).

A diferencia de las cinasas activadas por segundos mensajeros, las GRKs fosforilan selectivamente a receptores activados por su propio agonista y esto promueve su unión con las **arrestinas**, las cuales desacoplan por impedimento estérico a los receptores de las proteínas G (Pippig *et al.*, 1993). En la tabla 5 se resumen algunas de sus propiedades.

Tabla 5. Características de las GRKs.

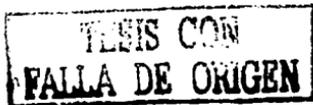
Familia	Tamaño	Localización	Modif. covalente	Activadores
GRK1	63 kDa	Retina, G. pineal	Farnesilación	Recoverina
GRK2 (β ARK1)	79 kDa	Leu, cerebro, pulm. hígado, Riñón	No determinado	G $\beta\gamma$, PIP ₂ , PKC, c-Src.
GRK3 (β ARK2)	80 kDa	Tub.Olf., cerebro, bazo, corazón,	No determinado	G $\beta\gamma$, PIP ₂
GRK4	66 kDa	Testículos, cerebro	Palmitoilación	No determ.
GRK5	68 kDa	Corazón, pulmón, Músc., hígado, riñón	No determinado	Policaciones, PIP ₂ .
GRK6	66 kDa	Cerebro, corazón, Músculo, pulmón	Palmitoilación	No determ.
GRK7	62 kDa	Retina (conos)	Farnesilación (?)	No determ.

G, glándula; Leu, leucocitos; pulm, pulmón; Tub. Olf., Tubérculo olfatorio; Músc. Músculo
Tomado de Ferguson, 2001.

3) Receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina.

Estos receptores (abreviados **RTKs**, por "Receptor Tyrosine Kinases") participan en fenómenos como el ciclo celular, proliferación, diferenciación, migración y metabolismo (Schlessinger, 2000). A pesar de no estar acoplados a proteínas G, sino que activan otras vías de transducción como la vía de la MAPK (en el caso del **Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico o EGFR**), recientemente se ha obtenido evidencia de que algunos miembros de los RTKs, entre ellos el EGFR, tienen la capacidad de comunicarse con algunos GPCRs en un proceso denominado "comunicación cruzada" o **cross-talk**, compartiendo mecanismos de regulación y desensibilización heteróloga (por tratarse de receptores de diferentes familias).

Se sabe que los RTKs desensibilizan a los GPCRs induciendo su fosforilación, fosforilando también a las proteínas G y también es posible que los GPCRs desensibilicen a los RTKs, aunque se sabe poco al respecto (Grewal *et al.*, 2001). Se ha comprobado la participación de una ruta de los RTKs, la cascada de ERK-MAPK, en un cross-talk con GPCRs acoplados a proteínas G_i y G_q, e involucra la transactivación del EGFR (Pierce *et al.*, 2001). Aunque hay muchos estudios sobre el cross-talk entre GPCRs y RTKs, este



trabajo se enfocará en el cross-talk entre los receptores α_{1b} -adrenérgico y el receptor para EGF, por lo que se menciona posteriormente con más detalle.

Con respecto al receptor α_{1b} -adrenérgico, que es el estudiado en este trabajo, se ha investigado su fosforilación y desensibilización inducida por otros GPCRs no adrenérgicos tales como el de endotelina (ET_A) (Vázquez-Prado *et al.*, 1997), el de bradicinina ($B2$) (Medina *et al.*, 1998) y el del ácido lisofosfatídico (LPA) (Casas-González *et al.*, 2000) así como otros receptores distintos a GPCRs, en especial de la familia de los RTKs como el receptor para PDGF y el receptor para EGF (Medina *et al.*, 2000).

XIX. Receptores adrenérgicos.

Estos pertenecen a la familia de los GPCRs. En 1948 el Dr. Ahlquist los dividió farmacológicamente en dos subtipos principales, los alfa (α) y los beta (β) (García Sáinz, 2002). Hasta 1974 se pensaba que los α eran una familia homogénea de receptores, pero posteriormente fueron clasificados en receptores α_1 (A, B y D) y α_2 -adrenérgicos (A, B y C) (Graham *et al.*, 1996; Langer, 1999). De forma similar los receptores β se han clasificado a en β_1 , β_2 y β_3 -adrenérgicos (Hieble and Bond, 1994). Tienen una estructura general parecida pero se diferencian por sus efectos fisiológicos y variantes en su secuencia de aminoácidos. Cada uno constituye una proteína de estructura alfa-helicoidal cuyo peso molecular varía entre 64 y 80 kDa (Gammeltoft and Kahn, 1995). Sus dominios transmembranales poseen de 20 a 28 aminoácidos hidrofóbicos (Graham *et al.*, 1996) y el β_2 - ha sido el más extensamente estudiado de los adrenérgicos.

Los agonistas naturales de estos receptores son las catecolaminas adrenalina (epinefrina) y noradrenalina (norepinefrina), ambas derivadas del aminoácido tirosina y sintetizadas en la médula de las glándulas suprarrenales. Estas hormonas provocan tienen distintas respuestas fisiológicas dependiendo del órgano y tejido donde actúen, controlando la contracción y relajación muscular, la proliferación celular, frecuencia y ritmo cardíaco, regulación de actividad de glándulas endocrinas y exocrinas, la síntesis y degradación de glucógeno entre otras (Norman and Litwack, 1997).

La epinefrina o adrenalina fue descubierta en 1895 por Oliver y Schäffer en extractos de glándulas suprarrenales, los cuales aumentaban la frecuencia cardíaca y la tensión arterial (García-Sáinz, 1999). Tales hormonas participan en un sinnúmero de procesos neurofisiológicos de gran importancia, por lo que una gran proporción de las células en un organismo animal poseen receptores adrenérgicos. De igual forma, se sabe que son

responsables de patologías como los estados maniaco-depresivos y padecimientos como el asma o la hipertensión arterial. Actualmente se estudian sus funciones *in vivo* en animales transgénicos con la sobre-expresión o anulación ("knock-outs") de los genes para estos receptores (Tanoue *et al.*, 2002).

Se han determinado claramente los sistemas específicos de transducción a los están acoplados los receptores adrenérgicos. Los α_1 están acoplados al sistema de fosfoinosítidos-calcio (a proteínas G_q), los α_2 están al sistema de la adenilato ciclasa de forma inhibitoria (a proteínas G_i) y los receptores β trabajan también mediante el sistema de la adenilato ciclasa pero de forma activadora (mediante proteínas G_s). En la tabla 6 se resumen algunas características de los receptores adrenérgicos.

Tabla 6. Características de los receptores adrenérgicos (clonados).

Subtipo de receptor	Longitud (a. a.)	Agonistas por potencias	Antagonistas por potencias	Distribución en tejidos	Principal proteína G	Sistema efector
α_{1a}	466	OXY >> E ≥ NE	PRAZ = WB-4101	Cerebro, V. deferentes,	G_q	↑ PLC ↑ Ca^{2+}
α_{1b}	514	OXY > E ≥ NE	PRAZ = WB-4101	Hígado, cerebro		↑ PLC ↑ Ca^{2+}
α_{1d}	561	NE ≥ E > OXY	PRAZ = WB-4101	Cerebro, V. deferentes,		↑ PLC y D ↑ Ca^{2+}
α_{2a}	449	OXY >> E ≥ NE	YOH >>> PRAZ	Aorta, cerebro	G_i	↓ AC ↓ Ca^{2+}
α_{2b}	452	OXY = E ≥ NE	YOH >> PRAZ	Hígado, riñón		↓ Ca^{2+} ↑ K^+
α_{2c}	457	OXY = E ≥ NE	YOH >PRAZ	Cerebro		↑ Na^+/K^+ Intercambio
β_1	465	ISO > NE ≥ NE	BETAX >> ICI-118551	Corazón, gl. pineal	G_s	↑ AC ↑ Ca^{2+}
β_2	417	ISO > E > NE	ICI-118551 > BETAX	Pulmón, próstata		↑ AC ↑ Ca^{2+}
β_3	399	NE > ISO > E	ICI-118551 >> ALP	Tejido adiposo		↑ AC ↑ Ca^{2+}

Abreviaciones: BETAX: betaxolol; NE: norepinefrina; PRAZ: prazosina; E: epinefrina; OXY: oximetazolina; YOH: yohimbina; gl.: glándula; V: vasos; PLC, D: fosfolipasa C, D; AC: adenilato ciclasa. Modificado de Norman and Litwack, 1997.

Receptor α_{1b} -adrenérgico (sistema de estudio).

El receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster fue el primero de los 3 subtipos α_1 en ser clonado y es considerado como el receptor prototipo de su grupo (Cotecchia *et al.*, 1988). A partir de su clonación, la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) sugirió cambiar la nomenclatura dejando con mayúscula (α_{1B}) a los receptores caracterizados en células o

TESTS CON
FALLA DE ORIGEN

tejidos que los expresan de forma natural o endógena y con minúscula (α_{1b}) a los receptores clonados (ver Vázquez-Prado *et al.*, 1997).

El receptor α_{1b} -adrenérgico (que en adelante se abreviará como α_{1b} -AR) tiene una longitud de 515 residuos de aminoácidos (α_{1b} -AR clonado de hámster por Cotecchia *et al.*, 1988), de los cuales 46 pertenecen a su extremo amino-terminal donde posee 4 sitios de N-glicosilación. Sus primeras dos asas intracelulares poseen residuos de cisteína importantes ya que forman enlaces disulfuro que ayudan al correcto plegamiento de la proteína y su tercera asa intracelular tiene sitios importantes para la interacción con proteínas G. Se cree que la Ser²⁰⁷ en su TM-V es importante para la interacción y especificidad con su ligando. Al final del tercer dominio transmembranal presenta el dominio DRY (por los residuos de aminoácidos Gly-Thr-Tyr) que presentan todos los demás receptores adrenérgicos así como muchos otros GPCRs. El α_{1b} -AR se acopla a la vía de la PLC mediante proteínas G_{q/11}, G₁₄ y G₁₆, activando la movilización de Ca²⁺ intracelular y la producción de Inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) (Graham *et al.*, 1996). Ensayos con mutaciones puntuales han determinado a los residuos Arg²⁵⁴, Lys²⁵⁸ y Leu¹⁵¹ como los sitios directos de interacción del α_{1b} -AR con la proteína G α_q (Greasley *et al.*, 2001). Dentro de las respuestas fisiológicas que se le han atribuido específicamente a este receptor se han descrito, en ratones knock-out del α_{1b} -AR, la regulación de la presión sanguínea y la regulación homeostática de la glucosa (Cotecchia *et al.*, 2002).

Su desensibilización homóloga ha sido estudiada tanto en sistemas nativos (Leeb-Lundberg *et al.*, 1987) como en sistemas transfectados (Lattion *et al.*, 1994; Diviani *et al.*, 1996, 1997; Vázquez-Prado *et al.*, 1997). Se ha demostrado que su extremo carboxilo juega un papel importante en la fosforilación y desensibilización (Lattion *et al.*, 1994), así como la participación de las GRKs 2 y 3 y se ha descartado a la PKC en este proceso (Diviani *et al.*, 1996). Se han caracterizado los sitios de fosforilación del α_{1b} -AR por GRKs, siendo las serinas Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰ en su extremo carboxilo (Diviani *et al.*, 1997).

Se han observado diferencias en su internalización con los distintos tipos celulares transfectados con este receptor. En fibroblastos Rat-1 (que es la línea celular empleada en este trabajo) se ha observado que su internalización era lenta en comparación con la ocurrida en células HEK-293 (Human Embryonic Kidney) (Lattion *et al.*, 1994; Vázquez-Prado *et al.*, 1997).

En sistemas transfectados la PKC desensibiliza al α_{1b} -AR fosforilándolo en su extremo carboxilo (Lattion *et al.*, 1994) en los sitios Ser³⁹⁴ y Ser⁴⁰⁰ (Diviani *et al.*, 1997). Se ha demostrado que el TPA bloquea la acción del α_{1b} -AR mediante su fosforilación y su

desacoplamiento de las proteínas G. Este proceso se ha estudiado utilizando moléculas análogas no hidrolizables del GTP como el $[S^{35}]GTP\gamma S$, deteniendo el ciclo de hidrólisis de GTP de la subunidad G_α (García-Sáinz *et al.*, 1999b).

El estudio del cross-talk entre el α_{1b} -AR y receptores acoplados a proteínas G_q y a G_i o RTKs, ha identificado varias proteínas participantes. El receptor para endotelina ET_A (acoplado a G_q) induce la fosforilación y desensibilización del α_{1b} -AR a través de la PKC y de una proteína cinasa de residuos de tirosina aún no identificada que actúa en una cascada de fosforilaciones independiente de PKC (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). También se ha visto como el receptor ET_A puede inducir la transactivación del receptor para EGF (Daub *et al.*, 1996) y otros mediante Ca^{2+} (Zwick *et al.*, 1997).

El **ácido lisofosfatídico (LPA)** produce una fosforilación al α_{1b} -AR mediante proteínas G sensibles a toxina pertussis (G_i), PKC y la **fosfatidil-inositol-3-cinasa o PI3K** (Casas-González *et al.*, 2000). El modelo propuesto para la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por LPA incluye: 1) activación de proteínas G sensibles toxina pertussis (G_i) por parte del receptor para LPA, 2) activación de la PI3K mediante el dímero $G\beta\gamma$, 3) fosforilación y activación de la PKC inducida por la PI3K y 4) fosforilación y desensibilización del α_{1b} -AR inducida por la PKC (Casas-González *et al.*, 2000; García-Sáinz *et al.*, 2000).

El LPA induce un cambio conformacional sobre sus receptores al acoplar su cadena acil en la cavidad hidrofóbica del receptor de tal forma que el grupo fosfato del LPA queda orientado para interactuar con los residuos cargados positivamente en la porción extracelular del receptor y esto lo lleva al cambio conformacional que produce su activación y acoplamiento con proteínas G (Moolenaar, 1995). Enseguida se detalla el funcionamiento del LPA y sus receptores.

10	20	30	40	50	60	70
KMPDLDTGHN	TSAPAHNGEL	KDAMPTGPMQ	TSSNSTLPQL	DVTRATISVGL	VLGAFILPAI	VGMILVILVY
	*	*	*			
80	90	100	110	120	130	140
ACNRHLNFT	WTFIVMLAIA	DLLLSFTDLP	FSATLEVLGY	WVLRIFCDI	WAAVDVLCT	ASILSLCAIS
	TM-II			TM-I		
150	160	170	180	190	200	210
IDRYIGVRS	LQYPTLVTR	KAILALLEVM	VLSSTVISGF	LLQWKEPAP	DDKECGVTK	PFYALFBSLG
↔		TM-IV				
220	230	240	250	260	270	280
SYIPLAVIL	VMYCVYIVA	KRTTKMLEAG	VHKEMSNSE	LTLRIKEMF	HEDTLSSTKA	KOHNPSSIA
TM-V			Región-Gα _q			
290	300	310	320	330	340	350
VKLFKFSREK	KAAKTLOIVR	GMFILCWLPF	FIALPLGSLF	STLKPPDAVF	KVVFWLQYFM	SCLNPIIYPC
	TM-VI			TM-VII		
360	370	380	390	400	410	420
SKSEFKIAPM	SILOCQCRGG	RRRRRRRLG	ACATYRPWT	RGGSLENSQS	EKDSLDDSGS	CMSSGQRTLP
				Δ	Δ	↑ ↓
430	440	450	460	470	480	490
SASPSPTGLG	RGTPPVELC	APFEWKPGL	LSLPEPPQR	GRLDSPLYT	FKLLQRPES	GTEGDASMG
500	510					
CDTTDLANG	QPGFKSNMPL	APGHF				

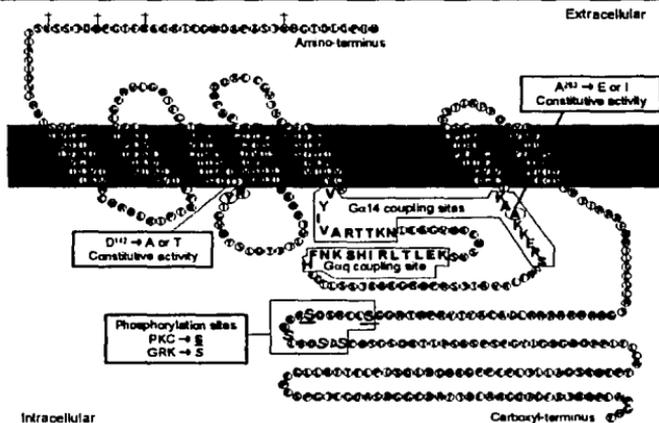


Fig. 6. Secuencia de aminoácidos y modelo estructural del receptor α_{1b} -adrenérgico, mostrando los sitios de N-glicosilación (*), dominios transmembranales (TM-), el dominio DRY (↔), región de reconocimiento por $G\alpha_q$ y los sitios de fosforilación por PKC (Δ) y por GRK (\uparrow y \downarrow). Tomado de García Sáinz *et al.*, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. El Ácido Lisofosfatídico (LPA).

El 1-*acil*-glicerol-3-fosfato o ácido lisofosfatídico (LPA) es un fosfolípido polar derivado de los fosfolípidos de la membrana plasmática que media múltiples procesos celulares (Ham *et al.*, 2002; Hla *et al.*, 2001). Dentro de sus muchas respuestas biológicas se encuentran la agregación plaquetaria, la contracción del músculo liso en pulmón (Towes *et al.*, 2002), la proliferación celular (en fibroblastos, células endoteliales, músculo liso y queratinocitos), proliferación epidérmica *in vivo* (en piel de ratón), media respuestas inmunes (atrayendo células T y B) y procesos inflamatorios (Gräler and Goetzl, 2002), la adhesión focal y formación de fibras de stress en fibroblastos, retracción de células neuronales, ayuda a la unión de fibronectina con la superficie celular (en células adherentes), al rearreglo del citoesqueleto, inhibe la comunicación por gap-junction y participa en la liberación de neurotransmisores (en células PC12) (Moolenaar, 1995b). Dado que estructuralmente es el más sencillo de los glicerofosfolípidos, sorprende que participe en un gran número de funciones fisiológicas. Históricamente se la había considerado como un segundo mensajero que regulaba algunas funciones fisiológicas, sin embargo con el descubrimiento de los receptores para LPA su conocimiento se ha ido ampliando. Se cree que estos receptores evolucionaron junto con el desarrollo de los sistemas inmune, cardiovascular y nervioso, ya que se han detectado en peces y anfibios pero no en organismos filogenéticamente inferiores (Hla *et al.*, 2001).

El LPA es un constituyente natural del plasma sanguíneo, en donde normalmente se le encuentra asociado a albúmina en concentraciones de 2 a 20 μM (en mamíferos), siendo las especies de LPA oleoil- y palmitoiladas las dominantes (Moolenaar, 1995b). El mayor conocimiento sobre su síntesis se ha obtenido de células plaquetarias con la hidrólisis de fosfolípidos y diacil-glicerol (DAG) (dependiente de Ca^{2+}) para formar ácido fosfatídico (PA) y posteriormente, en la mayoría de los casos, la fosfolipasa A2 (PLA_2) media la deacilación del PA para formar LPA. Se sabe que también otros tipos celulares sintetizan LPA, entre ellos los fibroblastos.

Cuando se libera LPA de la hidrólisis de los fosfolípidos, por su naturaleza hidrofílica (al poseer un grupo OH- libre y un grupo fosfato de importante participación) puede escapar rápidamente de la membrana. Cuando es liberado hacia el espacio extracelular, el LPA es hidrolizado rápidamente y se forma monoacil-glicerol. Esta hidrólisis enzimática sirve como reguladora de la duración y magnitud de los efectos del LPA (Moolenaar, 1995b).

Receptores para LPA.

Los efectos del LPA son desencadenados por su unión a sus receptores, los cuales pertenecen a la familia de los GPCRs (Contos *et al.*, 2000; Fukushima and Chun, 2001; Hama *et al.*, 2002; Hordik *et al.*, 1994; Moolenaar, 1995a and 1995b). Los primeros estudios mostraron, mediante experimentos de fotoafinidad, a una proteína de membrana de 30 a 40 kDa en varios tipos celulares (neuronas, cancerosas y fibroblastos) que podía detectarse por LPA marcado radiactivamente, sugiriendo su papel como receptor para LPA (van der Bend *et al.*, 1992). El primer receptor para LPA fue descubierto en 1996 estudiando el desarrollo del córtex cerebral. Se encontró un gen llamado "gen de la zona ventricular" o *vzg-1* (por *ventricular zone gen-1*) (Hecht, 1996), al que después se le encontró gran similitud en su secuencia de aminoácidos con un GPCR para lisofosfolípidos (Chun *et al.*, 1999). La nomenclatura más reciente avalada por la IUPHAR coloca a los receptores para lisofosfolípidos (LPLs) en dos familias según su agonista natural. La primera familia es la de los receptores para LPA y la otra es para la esfingosina-1 fosfato (S1P). Actualmente se conocen 3 receptores para LPA: LPA₁, LPA₂ y LPA₃, los cuales corresponden a los receptores llamados inicialmente *edg-2*, *edg-4* y *edg-7*, respectivamente (*edg* por "endothelial differentiation gen", por ser como se habían reportado al principio). En el otro grupo se ubican los 5 receptores conocidos para S1P: S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅ (que corresponden a *edg-1*, *edg-5*, *edg-3*, *edg-6* y *edg-8*, respectivamente) (Lynch, 2002). En la tabla 7 se resumen las propiedades de los receptores para LPA.

Tabla 7. Propiedades de los receptores para LPA.

Receptor	Longitud (a. a.)	Peso (kDa)	Proteína G Efectora	Efectos fisiológicos
LPA ₁	364	41.2	G ₁₀ , G _{12/13} y G _q	↓AC, ↑PLC, ↑MAPK ↑ Fibras de estrés, inhibe apoptosis y ↑ ac. araquidónico
LPA ₂	348	38.9	G ₁₀ , G _{12/13} y G _q	↓AC, ↑PLC, ↑MAPK ↑ ácido araquidónico
LPA ₃	354	40.3	G ₁₀ y G _q	↓AC, ↑PLC, ↑MAPK ↑ ácido araquidónico

Longitud y peso tomados de receptores de ratón (Contos *et al.*, 2000).

Vías de señalización para LPA.

Los receptores para LPA se acoplan a todos los tipos de proteínas G, excepto a G_s (en condiciones fisiológicas). Se ha identificado al menos cuatro vías de señalización (rev. en Contos *et al.*, 2000):

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 1) **Estimulación de PLC y PLD** por la subunidad G_{α} de proteínas de la familia G_q (que incluye a G_{q1} , G_{11} , G_{14} y $G_{15/16}$), así como por el dímero $\beta\gamma$ de proteínas G_q . En fibroblastos también se induce la liberación de ácido araquidónico por la PLA_2 . La PLD es activada independientemente de PKC para formar ácido fosfatídico.
- 2) **Inhibición de la AC**, por la participación de proteínas G sensibles a toxina *pertussis* (PTX por "Pertussis Toxin"), es decir proteínas G_i , activadas por LPA, que disminuyen rápidamente los niveles de AMPc, así el LPA puede contrarrestar el efecto de los agonistas que activan a la AC.
- 3) **Activación de Rho** mediante la activación de PLC. Rho media los procesos de reorganización del citoesqueleto e induce la fosforilación en tirosina de proteínas de adhesión focal y otras asociadas al citoesqueleto. La inactivación por ADP-ribosilación de Rho por la toxina C3 de *Clostridium botulinum* inhibe estos efectos en el citoesqueleto y la fosforilación en tirosina de otras proteínas.
- 4) **Activación de Ras/MAPK y PI3K**. El LPA, mediante la vía de la MAPK (Proteína Cinasa Activada por Mitógenos o Mitogen Activated Protein Kinase), induce la proliferación celular a través de proteínas G sensibles a toxina *pertussis* (PTX), es decir $G_{\alpha o}$. Cuando se activa la MAPK, esta se transloca al núcleo celular donde fosforila a factores de transcripción relacionados con la síntesis de DNA y la división celular. Algunos estudios han puesto como punto clave la activación por LPA de Ras (miembro de las proteínas G de bajo peso molecular) (Moolenaar, 1995a), la cual tiene como efector a la vía de la MAPK. Aunque el proceso exacto se desconoce, se sabe que su dímero $\beta\gamma$ es responsable de la activación de la MAPK dependiente de Ras (Crespo *et al.*, 1994). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que la activación de la MAPK por LPA involucra la transactivación dependiente de proteínas G de RTKs mediante **metaloproteasas** de membrana (Daaka, 2002). **La fosfatidilinositol 3-cinasa o PI3K también es activada por LPA** y se ha propuesto que esta cinasa es una de las primeras participantes en la cascada de activación de la MAPK en respuesta a LPA (Yart *et al.*, 2002a).

La fosfatidilinositol 3-cinasa o PI3K.

Las PI3Ks constituyen una familia conservada de cinasas lipídicas que catalizan la fosforilación del anillo de inositol en la posición 3' de los fosfoinosítidos. Esto produce lípidos que ahora se consideran como organizadores espacio-temporales de vías de

señalización involucradas en la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, organización del citoesqueleto y tráfico en la membrana (Yart *et al.*, 2002). A la PI3K se le considera un punto medular en la activación de numerosas vías de señalización ya que sus productos, en especial el PIP₃, es capaz de activar proteínas tales como la PKB (Proteína Cinasa B), la PDK (Phosphoinositide-Dependent Kinase), PKC (atípicas) y a la PLC- γ entre otras. La PI3Ks se han ordenado en tres clases (I, II y III) según su estructura molecular y su especificidad por sustrato (Wymann and Pirola, 1998; Yart *et al.*, 2002a).

Las PI3Ks de la clase I son las mejor caracterizadas. Usan como sustrato al fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP₄) y fosfatidilinositol 4, 5 -bisfosfato (PIP₂) para producir respectivamente PI3P, PIP₂ y fosfatidilinositol 3, 4, 5 -trisfosfato (PIP₃). Estas PI3Ks clase I son heterodímeros constituidos por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) y una unidad reguladora (ya sea una p85 o bien p101). La p110 tiene cuatro isoformas todas caracterizadas (p110 α , β , γ y δ) y esta dividida a su vez en dos subclases (A y B) dependiendo del tipo de subunidad reguladora a la que se acople. La **clase I_A** incluye a las p110 α , β y δ las cuales se asocian a una p85 que posee dominios de homología 2 a Src (SH2) cuya cualidad es unirse a residuos de tirosina fosforilados como los de las RTKs (Wymann and Pirola, 1998). Los heterodímeros p110/p85 son activados por cinasas de tirosina una vez que los dominios SH2 de la p85 se unen al fragmento Tyr-X-X-Met fosforilado del receptor o bien de una proteína adaptadora.

La **clase I_B** esta representada por la subunidad catalítica p110 γ asociada a una subunidad reguladora p101 que no tiene homología con ninguna otra proteína pero le da a la p110 γ la capacidad de ser activada directamente por subunidades G $\beta\gamma$ (Murga *et al.*, 2000; (Wymann and Pirola, 1998) .

Las enzimas de la clase II pueden fosforilar PI y PI4P y tienen un dominio C2 de unión a calcio. La función y regulación de estas PI3Ks es poco conocida hasta ahora.

Las PI3K del tipo III solo pueden fosforilar PI y contribuyen al tráfico en la membrana a través de su interacción con PI3P y el dominio FYVE de interacción proteína-proteína.

Activación de la PI3K por LPA: participación de p110 β .

En muchos estudios está demostrado que la PI3K es muy importante en la señalización del LPA (rev. en Yart *et al.*, 2002a; Yart *et al.*, 2002b). Originalmente se pensaba que p110 γ mediaba los efectos del LPA debido a que puede ser activada por el dímero G $\beta\gamma$. Los estudios que apoyan esta idea demuestran la participación de la PI3K γ en el efecto de GPCRs (el muscarínico M2) sobre la activación de la vía de la MAPK (Lopez-Illasaca

et al., 1997). Sin embargo se ha visto que en células COS transfectadas con una mutante dominante negativa de la p110 γ la producción de PIP₂ y PIP₃ (productos de la actividad de la PI3K) no se ve afectada, mientras que con la sobre expresión de una p110 α ó β este proceso se potenciaba (Laffargue *et al.*, 1999). Se encontró también que una proteína adaptadora llamada Gab1, que contiene sitios de unión a la p85 de la PI3K I α y que una vez fosforilada activa a la p110 β , era fosforilada a su vez por el receptor para EGF bajo la estimulación del receptor para LPA. Lo anterior mostraba dos cosas: que la PI3K que estaba mediando los efectos del LPA no era p110 γ sino p110 β , y que el receptor para EGF estaba participando mediante su transactivación inducida por LPA. Los estudios han mostrado que una activación eficiente de PI3K inducida por LPA depende de la capacidad de p110 β de integrar dos diferentes señales generadas por GPCRs: la liberación de G $\beta\gamma$ y la activación de la vía EGFR/Gab1. Otros estudios confirman la importancia de la p110 β en la acción de los GPCRs al activar a la Akt/PKB (Protein Kinase B) mediante esta PI3K (Murga *et al.*, 2000). Recientemente se esta considerando a la p110 β como un importante efector en la señalización del LPA (Yart *et al.*, 2002).

XI. El receptor para EGF.

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) fue llamado así en la década de los 60's por el Dr. Stanley Cohen al descubrirlo como promotor de la proliferación en cultivos de células epidérmicas embrionarias. Su trabajo a lo largo de 30 años sobre el estudio de esta proteína le acreditó el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1986. Posteriormente se determinó la presencia del EGF en tejidos humanos y actualmente es considerado uno de los agonistas más importantes en la inducción de la proliferación celular. El receptor para EGF (en adelante abreviado **EGFR**) es una glicoproteína de 170 kDa con 1186 residuos de aminoácidos (Carpenter and Cohen, 1990) y fue el primer receptor de su familia en ser clonado (ver Ullrich *et al.*, 1984). Perteneció a la familia de los receptores con actividad de cinasa de tirosina o **RTKs**. Dentro de esta misma subfamilia se encuentran los receptores HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4. Su estructura consta de un dominio extracelular para la unión de ligandos, entre los cuales se han descrito hasta ahora seis miembros: el EGF, el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF- α), el heparin-binding EGF-like growth factor (**HB-EGF**), a la anfirregulina, betacelulina y epirregulina (Leserer *et al.*, 2000; Riese and Stern, 1998). Los seis ligandos presentan el dominio EGF que consta de seis residuos de cisteína

separados que forman tres enlaces disulfuro que estabilizan la conformación de la proteína. En general estos ligandos son sintetizados como precursores glicosilados transmembranales que son liberados proteolíticamente para producir los ligandos maduros (rev. en Massagué and Pandiella, 1993).

EL EGFR posee un dominio transmembranal hidrofóbico y un dominio intracelular con sitios conservados de tirosina en donde es fosforilado. Su activación es promovida por la unión con su ligando, lo que promueve la formación de homo- o heterodímeros (con otros miembros de su familia) y su fosforilación en su dominio citoplásmico. Esto expone sitios de unión con dominios SH2 específicos para proteínas adaptadoras como Shc y Grb2. La formación de estos complejos Shc-Grb2 activa la proteína Sos (un factor de intercambio de nucleótidos) la cual activa la cascada de la MAPK vía Ras/Raf. También se sabe que el EGFR activa a otras enzimas, entre ellas a las de la familia Src (cinasa citoplásmica involucrada en la organización del citoesqueleto y respuestas proliferativas) y a la PI3K (Ullrich and Schlessinger, 1990), aunque esta activación de PI3K inducida por EGFR es relativamente débil si se compara con la inducida por otros RTKs (Prenzel *et al.*, 2001). La internalización es una de las formas de regulación de estos receptores (Luttrell *et al.*, 1999), que una vez fosforilados son invaginados dentro de vesículas cubiertas de clatrina y los receptores que no se disocian del EGF después de haber sido sometidos al pH ácido del interior de la vesícula son degradados por lisosomas (Prenzel *et al.*, 2001).

Transactivación del receptor para EGF.

El proceso de transactivación, en el caso del EGFR, ha sido definido como aquel estímulo que provoque la liberación de ligandos que activen al EGFR independientemente de su actividad previa (Carpenter, 1999). Debido a que el EGFR se convirtió en un punto crítico para la acción de los GPCRs sobre importantes funciones ya mencionadas, el estudio de su transactivación ha sido primordial. Por la cinética de la transactivación del EGFR y la dificultad inicial de medir la concentración de ligandos para EGF se pensó que el mecanismo debía involucrar exclusivamente entidades intracelulares (Zwick *et al.*, 1999). Ahora se sabe que este proceso involucra a Ca^{2+} , PKC (según el tipo celular) y las cinasas Pyk2 y Src (rev. en Leserer *et al.*, 2000). Algunos proponen además que las cinasas de Src participan en la inducción de la MAPK en respuesta a la activación de proteínas G_i (Luttrell *et al.*, 1997). Actualmente las evidencias apoyan la participación de ligandos maduros del EGFR. Se ha demostrado que estímulos con TPA y ionóforos de Ca^{2+} (activadores de la fosforilación del EGFR) así como activadores de proteínas G inducen la hidrólisis de los precursores de los ligandos para EGFR (rev. en Prenzel *et al.*,

2001). Así mismo una construcción quimérica entre el dominio extracelular del EGFR y el transmembranal e intracelular del receptor para PDGF (Platelet Derived Growth Factor, otro RTK), muestra la transactivación de este receptor-quimera, por lo que evidencia al dominio extracelular del EGFR como esencial en la transactivación (Prenzel *et al.*, 1999). El sistema de transactivación exclusiva por ligando del EGFR inducido por GPCRs más actualizado ha sido propuesto por el grupo del Dr. Axel Ullrich (Prenzel *et al.*, 1999). En su estudio inicial, diferentes ligandos de GPCRs como LPA, carbacol, trombina y bombesina inducen el procesamiento proteolítico del precursor membranar proHB-EGF para liberar al medio extracelular los ligandos maduros. El tratamiento de las células con un inhibidor de metaloproteasas (Batimastat o BB-94) bloquea este proceso, así como con el empleo de una mutante no tóxica de la toxina diftérica (CRM197) que actúa como antagonista de alta afinidad del precursor de membrana proHB-EGF lo cual abroga completamente la transactivación del EGFR y la fosforilación de SHC (proteína homóloga de Src). Así las metaloproteasas que median la liberación de ligandos maduros se presentan como un elemento relevante en la transactivación del EGFR. Cuando este proceso es inducido por GPCRs no solo se relaciona con la vía de la MAPK, sino también con la transcripción de genes, regulación de canales de Ca^{2+} , activación de la PI3K y rearrreglos en el citoesqueleto (rev. en Prenzel *et al.*, 2001).

El **HB-EGF**, que se cree es el que participa mayoritariamente en el proceso de transactivación, es sintetizado a partir de la hidrólisis del dominio extracelular de su precursor de membrana, el proHB-EGF, como un péptido soluble de 75-86 residuos de aminoácidos. El proHB-EGF es una proteína de membrana de 208 residuos de aminoácido con cinco dominios, el del péptido señal, el de unión a heparina (de ahí el nombre de "Heparin Binding" o HB), el dominio de unión al EGF, el dominio transmembranar y el intracelular (Higashiyama *et al.*, 1991).

La intercomunicación que existe entre este tipo de receptores y GPCRs ha sido bien estudiada. Se sabe que además del LPA, la endotelina y la trombina activan al EGFR en células Rat-1 (lo que lleva a la activación de la MAPK). En el caso de LPA, la transactivación del EGFR puede ocurrir mediante vías sensibles e insensibles a toxina *pertussis* (Daub *et al.*, 1997). Este proceso de transactivación es bloqueado con Tyrphostin (AG1478), inhibidor selectivo del EGFR, así como con mutantes negativas del EGFR que bloquean la inducción de respuestas mitogénicas inducidas por GPCRs. De igual forma se ha determinado que la transactivación del EGFR inducida por LPA y Angiotensina II inducen la síntesis de proteínas (Voisin *et al.*, 2002). También la bombesina (en células COS-7), bradicinina (en células PC12), carbacol (en COS-7,

HEK293 y T84) y angiotensina II (en células de músculo liso) inducen la transactivación del EGFR (rev. en Wu and Cunnick, 2002).

Metaloproteasas.

Las metaloproteasas (Matrix MetalloProteinases o MMPs) son una familia de enzimas denominadas "endopeptidasas de Zinc" debido a que unen un átomo de zinc en su sitio activo. Están involucradas con la degradación de la matriz extracelular; colectivamente pueden degradar proteínas como el colágeno, proteoglicanos, fibronectina y laminina, todas ellas componentes de la matriz extracelular, por lo que están implicadas en la remodelación del tejido conectivo asociado con el desarrollo embrionario. Estas proteínas tienen inhibidores naturales llamados Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas (Tissue Inhibitors of MMPs o TIMPs). Cuando el balance entre las MMPs y los TIMPs se rompe, surgen patologías como la artritis reumatoide o la osteoartritis, arteriosclerosis, tumores, metástasis y fibrosis, todas ellas relacionadas con la acumulación excesiva de matriz extracelular, por lo que en los últimos años las MMPs se han convertido en blancos terapéuticos para corregir estos padecimientos. Así mismo se ha estudiado el efecto de inhibidores sintéticos de bajo peso molecular de estas proteínas, como el batimastat o BB-94, el cual posee una estructura de tipo hidroxamato que mimetiza a la del colágeno y eso facilita su reconocimiento con la MMP, donde se une al sitio activo y atrapa al átomo de zinc, bloqueando así su actividad proteolítica (Wojtowics-Praga *et al.*, 1997).

Se sabe de su existencia en vertebrados, invertebrados y plantas. Actualmente se han descrito 25 metaloproteasas en vertebrados (Woessner, 2002), 17 de ellas en humanos y todas comparten un grado significativo de homología en su secuencia de aminoácidos y una organización común de sus multi-dominios (Bode *et al.*, 1999), constituidos por un dominio del péptido señal, un dominio pre-péptido, el dominio catalítico con el sitio de unión a zinc altamente conservado, un dominio de tipo haemopexina unido al sitio activo por una región de bisagra, y el dominio transmembranal (Hidalgo and Eckhardt, 2001).

Estas MMPs están muy relacionadas con otra familia de enzimas llamadas ADAM (por a disintegrin and metalloproteinase, es decir poseen un dominio de metaloproteasa y otro de desintegrina, ambos dominios proteolíticos) y, al igual que las MMPs, participan en la proteólisis y remodelación de la matriz extracelular y otros elementos. De esta familia solamente a ADAM10, ADAM17 y ADAM9 se le ha detectado actividad proteolítica en dominios extracelulares de precursores membranales de ligandos (Chang and Werb, 2001) y de estos solo ADAM9 tiene reportada su participación en la liberación de HB-EGF inducida por TPA (Izumi *et al.*, 1998).

PARTE 3.

TRABAJO DE TESIS.

ANTECEDENTES.

Como ya se ha mencionado, la comunicación cruzada o "cross talk" entre los distintos tipos de receptores es importante para la activación de mecanismos de respuesta de la célula a su entorno. Se ha estudiado ampliamente este fenómeno entre diferentes GPCRs (rev. en Cordeaux and Hill, 2002) así como entre GPCRs y RTKs (rev. en Belcheva and Coscia, 2002; Luttrell *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 1997), en especial el de los GPCRs con el EGFR (Daub *et al.*, 1997; Leserer *et al.*, 2000; Prenzel *et al.*, 2001; Wu and Cunnick, 2002) y en menor grado la relación del EGFR y los receptores adrenérgicos (Cussac *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2000; Pierce *et al.*, 1997). Sin embargo, los reportes sobre el cross talk entre otros receptores y el α_{1b} -AR son aún más escasos. Actualmente se conoce de la participación del receptor para endotelina ET_A en la fosforilación y desensibilización del α_{1b} -AR en células Rat-1 (Vázquez-Prado *et al.*, 1997) en donde se determina la participación de la PKC al ser bloqueada parcialmente la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por endotelina en presencia de estaurosporina (un inhibidor específico de la PKC) y al incrementarse la fosforilación al activar directamente a la PKC con TPA. También se encontró el papel de proteínas cinasas de residuos tirosina ya que la genisteína (inhibidor de amplio espectro de proteínas cinasas de tirosina) bloquea parcialmente la fosforilación del α_{1b} -AR. El estudio excluye a proteínas G_i y determina una vía de activación alterna del receptor para EGF (ver Daub *et al.*, 1996) y finalmente se demuestra que el α_{1b} -AR se desensibiliza por acción del receptor ET_A .

En otro trabajo se estudió la fosforilación y desensibilización del α_{1b} -AR inducidas por ácido lisofosfatídico (LPA). En este trabajo se demuestra que la fosforilación del α_{1b} -AR es dependiente de la dosis ($EC_{50} \sim 50$ nM), relativamente rápida ($t_{1/2} = 1$ min) y aumentada 2.5 veces por el LPA. Se determina que esto ocurre por una vía sensible a PTX (por proteínas G_i) y que participan la PKC y la PI3K, ya que al estimular al receptor para LPA en presencia de estaurosporina o bisindolilmaleimida (inhibidores de la PKC) y de wortmanina o LY294002 (inhibidores de la PI3K) la fosforilación del α_{1b} -AR se bloquea totalmente. La desensibilización fue demostrada con ensayos de movilización de Ca^{2+} intracelular en donde el efecto del agonista NE se ve bloqueado al estimular previamente a las células con LPA $1\mu M$. En ensayos de unión con $GTP\gamma S[S^{35}]$ *in vitro* que miden la

actividad de proteínas G, demostraron que el LPA desensibilizaba al α_{1b} -AR disminuyendo su capacidad de acoplamiento con su proteína G. Además con el mismo tipo de ensayo se confirmó la participación de la PKC y de la PI3K en este proceso. Conjuntamente se demostró que el efecto del LPA estaba mediado específicamente por proteínas G_i (estimulando a las células con NE tras una preincubación con PTX (Casas-González, 2000)).

Se han estudiado el cross-talk entre los receptores para LPA (un GPCR) y EGF (un RTK), involucrando respuestas fisiológicas esenciales como la proliferación celular y la síntesis de proteínas. La evidencia que ya se ha presentado sobre el proceso de activación del receptor para EGF mediante el receptor para LPA y otros GPCRs ha mostrado la participación de al menos una metaloproteasa como mediadora de este fenómeno. Por lo tanto para seguir contribuyendo a la comprensión de la comunicación cruzada entre distintos tipos de receptores, en especial el sistema que involucra al receptor de LPA, al α_{1b} -AR y, con base en los antecedentes ya mencionados, también al receptor para EGF, este estudio se realizó con los objetivos que se mencionan a continuación.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar las entidades moleculares que participan en el proceso de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico (α_{1b} -AR) inducido por ácido lisofosfatídico (LPA).

Objetivos Específicos.

1. Estudiar el efecto de la activación de los receptores para LPA endógenos de fibroblastos Rat-1 sobre la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico sobre-expresado en esta línea celular.
2. Identificar las proteínas cinasas que participan en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por LPA en células Rat-1.
3. Determinar el papel de la transactivación del receptor para EGF en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por LPA.
4. Investigar la participación de metaloproteasas en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por LPA en el mismo tipo celular.

Para alcanzar estos objetivos se emplearon técnicas como el cultivo celular, marcaje metabólico celular con isótopo radiactivo de fósforo (^{32}P), fosforilación de proteínas, inmunoprecipitación, resolución de proteínas por SDS-PAGE y autorradiografía.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Para esta investigación se utilizaron células Rat-1/ α_{1b} , las cuales son fibroblastos de tejido conectivo de rata (*Rattus* sp.), transfectados de manera estable con el receptor α_{1b} -adrenérgico clonado de hámster por Cotecchia *et al.* (1988), es decir que el gen con la información del α_{1b} -AR está incluida en su genoma de forma artificial y permanente. Estas células fueron donadas por los Drs. R. J. Lefkowitz, M. G. Caron y L. Allen de la Universidad de Duke, en Durham, North Carolina. El medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium), el suero fetal de bovino (SFB), la tripsina, los antibióticos y otros reactivos utilizados para el cultivo celular, así como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se obtuvieron de Gibco BRL. El fósforo radioactivo [32 P]Pi (8500-9120 Ci/mmol) se obtuvo de New England Nuclear (Boston, MA). La (-)-Norepinefrina (NE), ácido lisofosfatídico (1-oleoyl) (LPA), tetradecanoil acetato de forbol (TPA), estaurosporina (ST), wortmanina (WT), AG1478 (tyrphostin) y los inhibidores de proteasas utilizados (leupeptina, bacitracina e inhibidor de tripsina de soya) fueron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO). El BB-94 (Batimastat) se obtuvo de British Biotech. La proteína-A-sepharosa fue de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

Cultivo Celular.

Las células Rat-1 fueron cultivadas en cajas de Petri de 10 cm de diámetro conteniendo 10 ml de medio DMEM con glucosa y glutamina, complementado con suero fetal de bovino al 10%, 300 μ g/ml de sulfato G-418 (análogo de neomicina), 100 μ g/ml de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina y 0.25 μ g/ml de anfotericina-B. Se mantuvieron en crecimiento a 37°C bajo una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂ como ya se ha descrito previamente (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). Todos los experimentos se realizaron con cultivos confluentes (células que cubren totalmente la superficie de la caja de cultivo en una monocapa) en placas de 6 pozos de 35 mm (capacidad aproximada de 1.2×10^6 células/pozo) y con privación de suero desde una noche anterior al experimento para eliminar sustancias en el suero o producidas por las células que puedan intervenir con la sensibilidad de las células a los estímulos experimentales.

Fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico.

Podemos dividir el trabajo experimental en tres etapas principales:

1. Con el objeto de estudiar el efecto del LPA sobre la fosforilación del α_{1b} -AR, el primer paso experimental consistió en una realizar una curva dosis-respuesta estimulando a las células Rat-1/ α_{1b} con LPA a varias concentraciones de magnitud micro-molar [μ M] durante 5 minutos (Casas-González *et al.*, 2000). Se utilizaron las técnicas de marcaje metabólico e inmunoprecipitación según el protocolo (Vázquez-Prado *et al.*, 1997).

Para los ensayos de fosforilación, las células en privación de suero durante la noche anterior al experimento fueron sometidas a un ayuno de fosfatos durante 1 hora incubándolas con medio DMEM carente de fosfatos, con el objetivo de disminuir las reservas de fosfato (PO_4^{2-}) de las células. Posteriormente se les incubó en el mismo tipo de medio, conteniendo [^{32}P]Pi (75 μ Ci/ml), durante 3-4 horas a 37°C bajo las condiciones ya mencionadas para permitir que las células incorporen este isótopo radioactivo en su metabolismo y posteriormente poder localizar las proteínas fosforiladas por autorradiografía. Según lo requiriera cada experimento, las células fueron preincubadas con los inhibidores wortmanina, estaurosporina, AG147B (tyrphostin) y BB-94 (Batimastat) durante 30 minutos y posteriormente se les estimuló con los agonistas correspondientes durante 5 minutos. Al finalizar el tiempo de estimulación, las células fueron colocadas sobre hielo con la intención de detener la cinética de las reacciones químicas mediante la baja temperatura y de remover el agonista mecánicamente al ser lavadas con PBS frío ("Ice-cold PBS"). Enseguida se sometieron a lisis durante 1.5 horas sobre hielo en presencia de buffer conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 1%, SDS 0.05%, NaF 50 mM, Na_3VO_4 100 μ M, β -glicerofosfato 10 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, fosfo-serina 1mM, fosfo-treonina 1 mM, fosfo-tirosina 1mM e inhibidores de proteasas: leupeptina 20 μ g/ml, bacitracina 500 μ g/ml, inhibidor de tripsina de soya 50 μ g/ml y PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 100 μ g/ml. Los lisados fueron centrifugados a 4°C a 12,700 g. Se recuperaron los sobrenadantes y se incubaron toda la noche (al menos 12 horas) a 4°C en presencia del suero del anticuerpo anti- α_{1b} -AR (Vázquez-Prado *et al.*, 1997) a una dilución 1:100 y de la proteína-A-sepharosa (1:25), esto para formar un complejo inmune-proteico que facilite la separación del receptor α_{1b} -adrenérgico de los restos celulares mediante su precipitación por centrifugación. Posteriormente estos

complejos se lavaron 4 veces con buffer frío conteniendo HEPES 50 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4, Tritón X-100 1%, SDS 0.05% y NaF 100mM. Después fueron desnaturalizados con buffer de muestra (Laemmli)-SDS conteniendo 5% de β -mercapto-etanol y en ebullición durante 10 minutos. Los complejos proteicos se separaron mediante la técnica de SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) con geles al 10%. Los geles se secaron y fueron expuestos durante 24 horas bajo una pantalla Phosphor-Screen de Molecular Dynamics. Los niveles de fosforilación del receptor fueron cuantificados con ayuda del hardware Molecular Dynamics Phosphor-imager (STORM) y de un software Imagequant (Sunnyvale, CA) y graficados con el programa Prism 3.0 de GraphPad Software (San Diego, Ca.). El análisis estadístico realizado entre grupos comparables fue mediante un ANOVA con un análisis Newman-Keuls de comparación múltiple con el software incluido en el Prism 3.0 (diferencias significativas a partir de $P < 0.05$).

2. El segundo grupo de experimentos tuvo como objetivo el encontrar la participación de diferentes proteínas cinasas en el efecto del LPA sobre la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, incluyendo la participación de proteínas cinasas de residuos de serina/treonina (como la PKC), cinasas lipídicas (como la PI3K) así como la actividad intrínseca de cinasa de residuos de tirosina que posee el receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). Para esto se emplearon tres inhibidores distintos: estaurosporina [300 nM] (inhibidor de la proteína cinasa C, PKC), wortmanina [100 nm] (inhibidor de la fosfatidilinositol-3-cinasa, PI3K) y AG1478 (Tyrphostin) [5 μM] (el cual tiene la capacidad de unirse con alta afinidad a los sitios de unión a ATP del receptor EGFR y HER2, bloqueando así su actividad intrínseca de cinasa). Las células fueron preincubadas con estos inhibidores durante 30 minutos y se estimularon durante 5 minutos con LPA [1 μM] o con EGF [100 ng/ml] según el inhibidor utilizado.
3. Un tercer grupo de experimentos se realizó para determinar la participación de metaloproteasas asociadas con la vía de transactivación del receptor para EGF en el efecto del LPA sobre la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. Se utilizó el inhibidor selectivo para metaloproteasas Batimastat (BB-94) [10 μM]. Las células fueron preincubadas en presencia de este inhibidor durante 30 minutos, estimulándolas posteriormente con LPA [1 μM], con EGF [100 ng/ml] o con TPA [1 μM] durante 5 minutos.

RESULTADOS.

A. Efecto del LPA sobre el receptor α_{1b} -adrenérgico.

La presencia del receptor α_{1b} -adrenérgico (α_{1b} -AR) en las células Rat-fue determinada mediante la técnica de inmunoprecipitación. Esta técnica fue lograda mediante un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente los 10 últimos residuos de aminoácidos del extremo carboxilo-terminal del α_{1b} -AR. El anticuerpo fue sintetizado en un sistema mamífero (conejo) inmunizado con el decapeptido mencionado (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). La proteína correspondiente al receptor α_{1b} -AR fue localizada en los geles de poliacrilamida como una proteína cuyo peso molecular corresponde aproximadamente a los 85 kDa, lo cual coincide con los datos reportados (80-85 kDa). En ensayos de fotoafinidad han validado el funcionamiento de este anticuerpo utilizando fentolamina o prazosina (antagonistas α_1 -adrenérgicos), bloqueando y marcando radiactivamente al receptor, confirmando que al menos el 80% de los receptores α_{1b} -adrenérgicos son inmunoprecipitados por este anticuerpo (Medina *et al.*, 1997).

Al estudiar el efecto del LPA sobre el α_{1b} -AR se encontró que su fosforilación en respuesta a la activación de los receptores para LPA con este fosfolípido obedece a un comportamiento dosis-dependiente (figura 1). Aunque a partir de la concentración de 0.1 μ M la fosforilación sobrepasó el doble de la del estado basal, el efecto máximo se encontró en la concentración de 1 μ M llegando casi a las 2.5 veces sobre el basal coincidiendo con datos ya reportados y la EC_{50} fue similar (EC_{50} = 24.6 nM) a la determinada originalmente de 50 nM (Casas-González *et al.* 2000). El tiempo de estimulación fue tomado de ese mismo estudio en donde una curva curso-temporal determinó una fosforilación cercana al punto máximo alcanzado a ese tiempo.

B. Participación de las proteínas cinasas PKC y PI3K en la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por LPA.

Con base en los reportes que señalan la acción directa de la proteína cinasa C (PKC) en la regulación del α_{1b} -AR así como la de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) sobre la PKC, se determinó la participación de estas proteínas cinasas con el empleo de inhibidores a concentraciones reportadas dentro del rango de inhibición específica para estas cinasas. En la figura 2 se puede observar el efecto sobre la fosforilación del α_{1b} -AR de los

Inhibidores de la PKC y de la PI3K, estaurosporina 300 nM (+ST) y wortmanina 100 nM (+WT), respectivamente. Las concentraciones están dentro del rango requerido para la inhibición específica de estas cinasas (Medina *et al.*, 2000). La incubación de las células Rat-1 durante 30 minutos con estos fármacos provocó que la fosforilación del α_{1b} -AR en respuesta al estímulo de 5 minutos con LPA cayera prácticamente a niveles basales ($P < 0.001$ vs. LPA control).

C. Papel de la actividad de cinasa de tirosina del receptor para EGF en la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por LPA.

Así mismo, se estudió el papel que tiene el receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) como cinasa de residuos de tirosina, con base en los reportes de la participación del EGFR en respuesta a la activación de los receptores para LPA así como la participación de una cinasa de residuos de tirosina en la regulación del α_{1b} -AR. Como puede observarse en la figura 3, la estimulación durante 5 minutos de las células con el EGF provocó un aumento importante en la fosforilación del α_{1b} -AR de aproximadamente 1.8 veces. El efecto del LPA nuevamente superó dos veces los niveles basales de fosforilación. Al incubar durante 30 minutos a las células en presencia del inhibidor del EGFR, el AG1478 (5 μ M) y estimularlas posteriormente 5 minutos con LPA 1 μ M y EGF 100 ng/ml, los niveles de fosforilación del α_{1b} -AR cayeron un 75 % para el efecto de LPA y prácticamente en su totalidad para el efecto del EGF, como puede verse en la gráfica y en la autorradiografía representativa (figura 3) ($P < 0.01$ vs. LPA y EGF controles).

D. Participación de metaloproteasas en el efecto del LPA sobre la fosforilación del α_{1b} -AR.

Por los antecedentes ya mencionados sobre la participación de metaloproteasas en el proceso de transactivación del receptor para EGF (EGFR) en respuesta otros GPCRs, se empleó un potente inhibidor de amplio espectro para metaloproteasas, el Batimastat (BB-94), a una concentración de 10 μ M. Como puede verse en la figura 4, la incubación por 30 minutos de las células Rat-1 con el BB-94 no afectó los niveles basales de fosforilación del α_{1b} -AR ($P > 0.05$ vs. Basal). Sin embargo la fosforilación inducida por LPA tras la incubación con BB-94 sí disminuyó de manera significativa ($P < 0.05$ vs. LPA control) aunque no de forma total. La activación de los receptores para EGF con su agonista (100 ng/ml) en presencia del BB-94, a diferencia del AG1478, no afectó los niveles de fosforilación del α_{1b} -AR, quedando prácticamente de la misma magnitud que los niveles

del control con EGF ($P > 0.05$ vs. EGF control). También se evaluó la participación de la PKC al ser activada directamente con TPA $1 \mu\text{M}$ durante 5 minutos. Como se observa en la figura 4, los niveles de fosforilación del α_{1b} -AR provocada por la PKC se elevaron 2.25 veces al incubar a las células con TPA. La preincubación con BB-94 provocó una ligera disminución en el nivel de fosforilación del α_{1b} -AR inducido por la activación directa de PKC aunque no significativa según el análisis estadístico ($P > 0.05$ vs. TPA control).

Efecto del LPA sobre la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico.

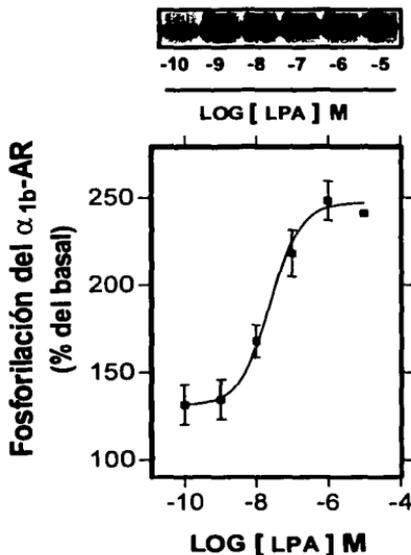


Fig. 1. Curva dosis-respuesta de la fosforilación del α_{1b} -AR por LPA. Células Rat-1 fueron estimuladas durante 5 min. con LPA a varias concentraciones, desde 0.1 nM (10^{-10} M) hasta 10 μ M (10^{-5} M). Se graficaron los datos promediados \pm E.S. de 5 determinaciones con cultivos diferentes. Se muestra la autorradiografía representativa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Participación de la PKC y de la PI3K en la fosforilación del α_{1b} -AR.

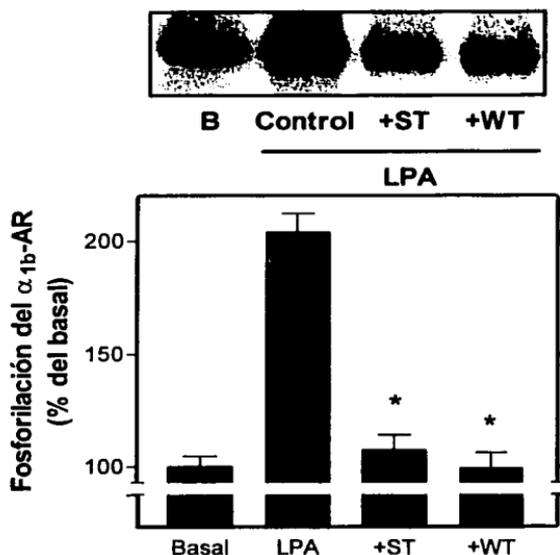


Fig. 2. Participación de la PKC y de la PI3K en la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por LPA. Células Rat-1 fueron incubadas durante 30 min. en presencia de estaurosporina (+ST) 300 nM y wortmanina (+WT) 100 nM previamente a la estimulación con LPA (1.0 μ M). Se presentan los promedios \pm E.S. de 3 determinaciones con cultivos distintos. * $P < 0.001$ vs. LPA control.

FALLA DE ORIGEN

Participación del EGF-R sobre la fosforilación del α_{1b} -AR.

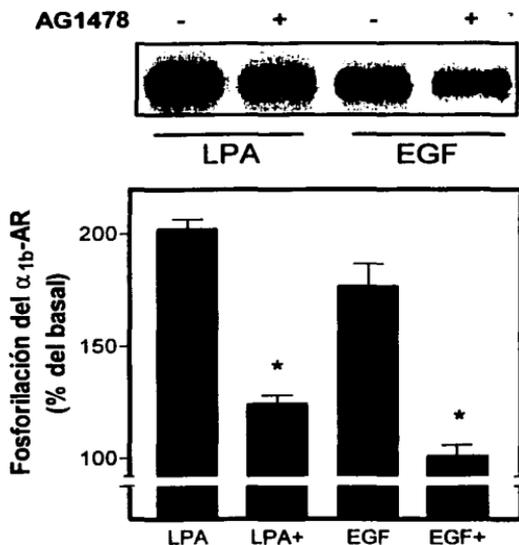
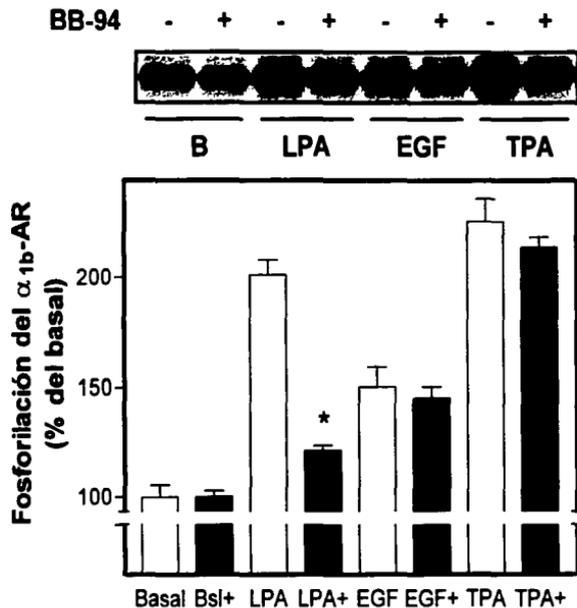


Fig. 3. Participación de EGFR sobre la fosforilación del α_{1b} -AR. Células Rat-1 fueron incubadas durante 30 min. en presencia (+) de AG1478 (5 μ M) previamente a la estimulación con LPA (1 μ M) y de EGF (100ng/ml). Se graficaron promedios \pm E. S. de 5 determinaciones usando cultivos diferentes. * $P < 0.01$ vs. LPA y EGF controles según el agonista utilizado en cada caso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Participación de metaloproteasas en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4. Fosforilación del α_{1b} -AR en ausencia (barras blancas) y presencia (barras negras) de BB-94. Células Rat-1 fueron incubadas en presencia de BB-94 (10 μ M) durante 30 min. y luego estimuladas con LPA (1 μ M), EGF (100ng/ml) o TPA (1 μ M). Se graficaron los promedios \pm E.S. de 5 determinaciones usando cultivos diferentes. *P<0.05 vs. LPA control. Se muestra la autorradiografía representativa.

DISCUSIÓN.

Los fibroblastos Rat-1 expresan de forma natural receptores para el EGF (Daub *et al.*, 1996; Herrlich *et al.*, 1998) y para el LPA (Casas-González, 2000) y están transfectados de manera estable con el α_{1b} -AR (Cotecchia *et al.*, 1988). El nivel de expresión de este último receptor se ha cuantificado en membrana con una concentración de 2 a 2.5 pmol/mg de membrana (Vázquez-Prado *et al.*, 1997).

En la figura 1 podemos observar que el LPA fue capaz de promover la fosforilación del α_{1b} -AR de una forma dosis-dependiente. Casas-González *et al.* (2000) demostraron la participación de proteínas G sensibles a Toxina *Pertussis* (PTX), es decir proteínas G_i , las cuales están reportadas como unas de las proteínas transductoras de los receptores para LPA (Contos *et al.*, 2000). Tanto en la gráfica como en la autorradiografía representativa se observa que a una concentración de LPA 1 μ M (log 10^{-6} M) la fosforilación del α_{1b} -AR alcanza su valor máximo sobre la fosforilación basal que presenta el α_{1b} -AR. Dado que los receptores para LPA activados indujeron la fosforilación del α_{1b} -AR mediante proteínas G_i (sensibles a PTX), es decir mediante la vía de la inhibición de la AC, es probable que el dímero $G\beta\gamma$ de la proteína G_i pudiera estar participando en algún proceso que llevara a la fosforilación del α_{1b} -AR. Esta hipótesis ha sido demostrada con el empleo de un plásmido codificante para el extremo carboxilo (residuos Gly⁴⁹⁵-Leu⁶⁸⁹) de la cinasa del receptor β -adrenérgico o β ARK, la cual tiene en la región Gln⁵⁴⁶-Ser⁶⁷⁰ un dominio de unión a $G\beta\gamma$ (Koch *et al.*, 1994) con alta afinidad por estas subunidades. El secuestro y la inactivación resultante del dímero $G\beta\gamma$ por el extremo carboxilo de la β ARK provoca un efecto inhibitorio sobre la fosforilación del α_{1b} -AR inducido por LPA (Casas-González *et al.*, 2003).

Originalmente se pensaba que los efectos del LPA eran mediados por las PI3K de la clase I_b activadas por el dímero $G\beta\gamma$. Algunos reportes apoyan este modelo de activación, en especial la de la PI3K γ mediante su subunidad catalítica p110 γ (de la clase PI3K- I_b) (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997). Sin embargo pronto se encontró que las PI3K de la clase I_a participaban en la mediación de los efectos del LPA mediante su subunidad adaptadora p85 con afinidad por residuos fosforilados de tirosina (Laffargue *et al.*, 1999). Esto sugería la participación de receptores con actividad de cinasa de tirosina en la regulación de los efectos del receptor para LPA. Posteriormente Medina *et al.* (2000) demostraron que la activación del receptor para EGF (que posee actividad de cinasa de residuos de tirosina) provocaba la fosforilación del α_{1b} -AR. Así mismo, recientemente Casas-González *et al.*

(2003) demostraron en ensayos de fosforilación con el empleo de una mutante negativa de la subunidad p85 (adaptadora de la PI3K I_A) en fibroblastos Cos-1 que eran estas las que participan en el proceso de fosforilación del α_{1b} -AR inducido por LPA y no la PI3K-I_B (PI3K γ). Estudios recientes han determinado cada vez con más evidencias la participación de p110 α ó β (PI3K clase I_A) en la transducción de otros GPCRs, en especial del receptor para LPA y su cross talk con el receptor para EGF (Laffargue *et al.*, 1999; Murga *et al.*, 2000; Yart *et al.*, 2002a; Casas-González *et al.*, 2003). En el presente trabajo, la inhibición prácticamente total de la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por LPA en presencia de wortmanina, confirma la participación de la PI3K, probablemente de la clase I_A (α ó β), activada por el dímero G $\beta\gamma$ en respuesta a la activación de los receptores para LPA (figura 2).

Se sabe que la PKC participa en la fosforilación y desensibilización heteróloga del α_{1b} -AR (Diviani *et al.*, 1997; Alcántara-Hernández *et al.*, 2001) inducida por endotelina (Vázquez-Prado *et al.*, 1997), por LPA (Casas-González *et al.*, 2000) y por EGF (Medina *et al.*, 2000). Se sabe también que para la activación de la PKC se requiere de DAG o Ca²⁺ (activación de la vía de la PLC- β por receptores acoplados a proteínas G_q) o bien de su activación por PI3K (vía PDK-1). Como los receptores para LPA actúan en la fosforilación del α_{1b} -AR mediante proteínas G_i y no por G_q, se estudió la participación de la PKC y la PI3K en el proceso. La activación directa de la PKC por ésteres de forbol como el TPA inducen una alta respuesta en la fosforilación del α_{1b} -AR de alrededor de 2.5 veces sobre los niveles basales (ver figura 4). El abatimiento prácticamente total de este efecto al incubarse las células con estaurosporina (inhibidor específico de la PKC), aún con la activación de los receptores para LPA (figura 2), señala la participación esencial de la PKC en la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por LPA. Los estudios sobre la determinación de cuál isoforma de PKC es la que participa en la fosforilación y desensibilización del α_{1b} -AR son escasos. Algunas evidencias por ensayos de co-inmunoprecipitación indican que las PKC α , δ y ϵ están asociadas al α_{1b} -AR en condiciones basales y que la estimulación con TPA o con el agonista norepinefrina refuerzan esta asociación (Alcántara-Hernández *et al.*, 2001). Cabe la posibilidad de que en este proceso estén participando varias isoformas de la PKC que actúen en diferentes vías o bien que pueda existir redundancia funcional.

Por otra parte, la desensibilización del α_{1b} -AR inducida por LPA ya ha sido demostrada con ensayos de movilización de Ca²⁺ intracelular y de unión de GTP γ [S³⁵] a proteínas G (Casas-González *et al.*, 2000). Este estudio confirma que el bloqueo específico de PKC y

PI3K bloquea, a su vez, la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por LPA, lo que indica que las cinasas actúan en secuencia y no por vías independientes. Este proceso secuencial involucra probablemente la participación de la PDK-1 activada por la PI3K, ya que es capaz de fosforilar todas las isoformas de la PKC en sitios conservados (Thr⁵⁰⁰) así como su activación por fosfoinosítidos como el PIP₃ (rev. en Sonnenburg *et al.*, 2001).

En muchos estudios se ha demostrado una intercomunicación entre GPCRs y RTKs, por ejemplo la de receptores para LPA con receptores para EGF (Daub *et al.*, 1997; Voisin *et al.*, 2002; Wu and Cunnick, 2002) y la de receptores para EGF con el α_{1b} -AR. Entre otros de los pocos estudios que abordan la transactivación del EGFR mediante receptores adrenérgicos se encuentra el del receptor α_{2b} -adrenérgico, el cual es capaz de activar la vía de MAPK mediante una metaloproteasa (Cussac *et al.*, 2002) mediante la fosfolipasa A, ácido araquidónico y sus derivados (Chen *et al.*, 2001).

Medina *et al.* (2000) demostraron que el EGF puede inducir la fosforilación del α_{1b} -AR de una forma dosis-dependiente alcanzando el efecto máximo a una concentración de 100 ng/ml. En este estudio, el EGF indujo la fosforilación del α_{1b} -AR de más de 1.5 veces sobre su fosforilación basal (figura 3). La incubación de las células con el inhibidor específico para la actividad de cinasa de tirosina del EGFR, tyrphostin (AG1478), provocó la inhibición completa del α_{1b} -AR inducida por la activación de los receptores para EGF (figura 3). El mismo efecto inhibitorio, aunque de menor magnitud, se observó en la respuesta a la activación de los receptores para LPA en presencia de AG1478, por lo que este resultado sugiere la participación del EGFR como un punto importante en la vía de señalización que tiene el LPA para inducir la fosforilación del α_{1b} -AR. Sin embargo al no ocurrir una inhibición total de la fosforilación en presencia de AG1478, el resultado sugiere la existencia de una vía alterna del efecto de la activación de los receptores para LPA sobre la fosforilación del α_{1b} -AR independiente del EGFR.

En el caso del proceso mediado por proteínas G_i, se ha sugerido que el dímero G $\beta\gamma$ está involucrado en la activación de cinasas de tirosina de la familia Src, seguida por la fosforilación en tirosina de proteínas adaptadoras que participan en las vías de otros receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs) (van Biesen *et al.*, 1995), de tal manera que se ha propuesto la inducción del proceso de transactivación del EGFR (Prenzel *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 2000) inducida por GPCRs.

Se sabe que el LPA puede activar la vía de la MAPK por la transactivación de RTKs dependiente de proteínas G mediante metaloproteasas asociadas a la membrana plasmática (en adelante MMPs) (rev. en Daaka, 2002). Una hipótesis de este mecanismo

es la que involucra la liberación de ligandos solubles del EGFR, en especial el HB-EGF, a partir de la hidrólisis por metaloproteasas de los dominios extracelulares de precursores anclados a la membrana plasmática (Daub *et al.*, 1996; Daub *et al.*, 1997; Laffargue *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 2001; Prenzel *et al.*, 1999; Zwick *et al.*, 1999). Estos ligandos al ser hidrosolubles son capaces de difundir por el espacio extracelular hasta activar de forma autocrina y paracrina a los receptores para EGF. El potente inhibidor de metaloproteasas Batimastat (BB-94) ha sido usado ampliamente para investigar este proceso (Dong and Wiley, 2000). El empleo de inhibidores específicos a concentraciones precisas ha sido una herramienta muy utilizada en el campo de la transducción de señales para determinar la participación de diferentes proteínas en un fenómeno dado. Al parecer la forma en la que actúa el BB-94 es acoplándose a la metaloproteasa en su sitio activo (donde contiene al zinc), lo que es suficiente para bloquear su actividad (Botos *et al.*, 1996; Wojtowics-Praga *et al.*, 1997).

Para estudiar la participación de metaloproteasas en la fosforilación del α_{1b} -AR se incubaron a las células Rat-1 con el BB-94 [10 μ M] estimulando con su agonista respectivo a los receptores para LPA, EGF y directamente a la PKC con TPA (figura 4). Los resultados mostraron una inhibición importante, aunque no total, del efecto del LPA sobre la fosforilación del α_{1b} -AR, lo que indica que las metaloproteasas participan como mediadoras del efecto de LPA sobre el EGFR y a última instancia, como se ha demostrado en el experimento anterior, del EGFR sobre el α_{1b} -AR.

La participación de metaloproteasas en la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por LPA mediada por EGF fue estudiada al estimular directamente a los receptores para EGF en presencia del BB-94. Los resultados no muestran diferencia significativa alguna con respecto a la fosforilación del α_{1b} -AR inducida por la activación del EGFR en ausencia de BB-94 (figura 4). A pesar de bloquear la liberación de ligandos para el EGFR con el BB-94, este receptor estaba siendo estimulado por su agonista de forma exógena a una concentración de 100 ng/ml. Este resultado prueba que el BB-94 no afecta el papel del EGFR activado directamente por su agonista sobre la fosforilación del α_{1b} -AR sino que el EGFR es un intermediario en este efecto inducido por LPA y además confirma la participación de metaloproteasas en este proceso.

La participación de la PKC fue probada de igual forma activándola con TPA en presencia y ausencia del inhibidor de metaloproteasas. Como se muestra en la figura 4, la activación de PKC lleva a la fosforilación del α_{1b} -AR por PKC de aproximadamente 2.5 veces con respecto al basal. Este estímulo en presencia de BB-94 no tuvo diferencias

significativas en el grado de fosforilación del α_{1b} -AR. Actualmente se desconoce la relación precisa de la PKC con la metaloproteasa en esta vía, aunque evidentemente son elementos importantes en el proceso de fosforilación del α_{1b} -AR. Hay evidencias que indican que el TPA a través de la PKC δ puede activar mediante un mecanismo intracelular a la metaloproteasa ADAM9 para liberar HB-EGF (Izumi *et al.*, 1998). Sin embargo, como se ha mencionado, es la PKC α la que suele encontrarse co-localizada en mayor proporción con el α_{1b} -AR. Los reportes sobre este fenómeno relacionado con receptores adrenérgicos son escasos. El más cercano sobre el receptor α_{2b} -AR involucra la activación de la MMP mediante la fosfolipasa A, ácido araquidónico y sus derivados (Chen *et al.*, 2001), lo cual induce la activación de la MAPK mediante este proceso (Cussac *et al.*, 2002). Un estudio paralelo a este en células Cos-1 indican un comportamiento similar bajo las mismas condiciones (Casas-González *et al.*, 2003).

En el caso de la transactivación del EGFR, hay un mayor número de evidencias de que la metaloproteasa-3 (MMP-3) es la encargada del proceso de liberación proteolítica de proHB-EGF (Suzuki *et al.*, 1997; Wu and Cunnick, 2002). Un modelo sugiere que la MMP-3 corta al precursor proHB-EGF, el cual se encuentra incrustado en la membrana, en la región comprendida entre Glu¹⁵¹-Asp¹⁵². Otro estudio realizado en células Vero-H sugiere que la hidrólisis de proHB-EGF inducida por LPA ocurre en los sitios Leu¹⁴⁸-Pro¹⁴⁹ o Pro¹⁴⁹-Val¹⁵⁰ (Hirata *et al.*, 2001). Así, estos datos junto con los que muestran la participación de la MCD9 (ADAM9) en la liberación de HB-EGF, sugieren la posibilidad de que puede tratarse de diferentes metaloproteasas participando en el proceso de transactivación del EGFR.

Por otro lado, debido a que el efecto inhibitorio de las metaloproteasas no es total sobre el efecto del LPA en la fosforilación del α_{1b} -AR, es posible que exista una vía alterna en donde el dímero G $\beta\gamma$ sea el responsable de activar directamente a las PI3K clase I α (probablemente p110- β) y estas a la PKC con la subsecuente fosforilación del α_{1b} -AR, de tal forma que el LPA induzca la fosforilación del α_{1b} -AR por dos vías, una que involucra a metaloproteasas y la transactivación del EGFR y otra independiente de estos eventos, pero ambas mediante la activación de la PI3K clase I α activada por el dímero G $\beta\gamma$, (proceso que es bloqueado por una mutante dominante negativa de la subunidad p85, Δ p85 (Casas-González *et al.*, 2003)) que lleva a la activación de la PKC la cual fosforila al α_{1b} -AR.

CONCLUSIONES.

Este estudio ha demostrado que el LPA regula la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico de manera dosis-dependiente y que participan las proteínas cinasas de residuos de serina/treonina PKC y la cinasa de fosfoinosítidos PI3K cuyo bloqueo individual es capaz de abatir totalmente el efecto del LPA sobre la fosforilación del α_{1b} -AR, lo que indica una participación secuencial de estas cinasas. Se determinó también que el receptor para EGF es un mediador parcial de la acción del LPA sobre el α_{1b} -AR y finalmente se demostró la participación de metaloproteasas de membrana en el proceso de transactivación del receptor para EGF inducido por LPA, todo en fibroblastos Rat-1/ α_{1b} .

Este trabajo contribuye al modelo que se ha propuesto recientemente para la acción de estas entidades moleculares sobre la regulación de la respuesta α_{1b} -adrenérgica (Casas-González *et al.*, 2000; García-Sáinz *et al.*, 2000; Casas-González *et al.*, 2003). En el modelo propuesto los receptores para LPA transducen su señal a través de proteínas G, cuya subunidad G $\beta\gamma$ es capaz de activar dos vías, una que involucra la activación de la PI3K y de la PKC (ya sea mediante la producción de fosfoinosítidos o vía PDK-1 o ambas) y otra vía que involucra la transactivación del EGFR por la acción de metaloproteasas de membrana que liberan moléculas de HB-EGF quien actúa como agonista del EGFR. Ambos procesos convergen en la activación de la PI3K la cual activa a la PKC y esta a su vez fosforila y desensibiliza al α_{1b} -AR.

Los resultados presentados en esta tesis contribuyen al primer trabajo que demuestra que la transactivación del EGFR participa en la fosforilación de un GPCR, en este caso del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por LPA. Este estudio apoya al nuevo concepto mecanístico de la transactivación del EGFR y contribuye de forma importante al conocimiento del cross-talk entre RTKs y GPCRs. Estos resultados proponen una nueva vía de transactivación en la regulación del receptor α_{1b} -adrenérgico.

REFERENCIAS.

- Albert, P. R. and Robillard, L. (2002). G protein specificity: traffic direction required. *Cell. Sign.* **14**, 407-418
- Alcántara-Hernández, R., Leyva-Illades, D. and García-Sáinz, J. A. (2001). Protein kinase C- α 1b-adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and myristate acetate. *Eur. J. Pharm.* **419**, 9-13
- Ambrose, C. James, M., Barnes, G., Lin, C., Bates, G., Altherr, M., Duyao, M., Groot, N., Church, D., Wasmuth, J. J. et al. (1992). A novel G protein-coupled receptor kinase gene cloned from 4p16.3. *Hum. Mol. Genet.* **1** (9): 697-703.
- Anborgh, P. H., Seachrist, J., Dale, L. and Ferguson, S. S. G. (2000). Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol. Endocrinol.* **14** (12): 2040-2053
- Asaoka, Y., Nakamura, S., Yoshida, K. and Nishisuka, Y. (1994). Protein Kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 414-417
- Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* **267** (25): 17882-17890
- Belcheva, M. M. and Coscia, C. J. (2002). Diversity of G-Protein-Coupled Receptor Signaling Pathways to ERK/MAP Kinase. *Neurosignals* **11**, 34-44
- Benovic, J. L. and Gomez, J. (1993). Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *J. Biol. Chem.* **268** (26): 19521-19527
- Benovic, J. L., Onorato, J. J., Arriza, J. L., Stone, W. C., Lohse, M., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1991). Cloning, expression, and chromosomal localization of β -adrenergic receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **266** (23): 14939-14946
- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2000). The calcium entry pas de deux. *Science* **287** (5458): 1604-1605
- Birnbaumer, L. (1992). Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta-gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* **71** (7): 1069-1072
- Bode, W., Fernández-Catalán, C., Tschesche, H., Nagase, H. and Maskos, K. (1999). Structural Properties of Matrix Metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 639-652
- Botos, I., Scapozza, L., Zhang, D., Liotta, L. A and Meyer, E. F. (1996). Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2749-2754
- Bourne, H. R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* **9** (2): 134-142
- Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Biasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1988). Removal of phosphorylation sites from the β 2-adrenergic receptor delays the onset of agonist-promoted desensitization. *Nature (Lond)* **333**: 370-373
- Bünemann, M., Lee, K. B., Pals-Ryjaarsdam, R., Roseberry, A. G. and Hosey, M. M. (1999). Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 169-192

Carman, C. V., Parent, J. L., Day, P. W., Pronin, A. N., Sternweis, P. M., Wedegaertner, P. B., Gilman, A. G., Benovic, J. L. and Kozasa, T. (1999). Selective regulation of $G\alpha_{q/11}$ by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J. Biol. Chem.* **274** (48): 34483-34492

Carozzi, A., Camps, M., Gierschik, P. and Parker, P. J. (1993). Activation of phosphatidylinositol lipid-specific phospholipase C-beta 3 by G protein beta gamma subunits. *FEBS Lett.* **315** (3): 340-342

Carpenter, G. (1999). Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J. Cell Biol.* **146** (4): 697-702

Carpenter, G. and Cohen, S. (1990). Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **265** (14): 7709-7712

Carty, D. J., Padrell, E., Codina, J., Birnbaumer, L., Hildebrandt, J. D. and Iyengar, L. (1990). Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three G_i proteins. *J. Biol. Chem.* **265** (11): 6268-6273

Casas-González, P. (2000). Regulación de la respuesta alfa 1b-adrenérgica. Tesis Doctoral. Facultad de Química, UNAM. 94 pp.

Casas-González, P., Ruiz-Martínez, A. and García-Sáinz, J. A. (2003). Lysophosphatidic Acid induces α_{1B} -Adrenergic Receptor Phosphorylation through $G\beta\gamma$, Phosphoinositide 3-Kinase, Protein Kinase C and Epidermal Growth Factor Receptor transactivation. *Biochim Biophys Acta* (en prensa).

Casas-González, P., Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J. A. (2000). Lysophosphatidic Acid Modulates α_{1B} -Adrenoceptors Phosphorylation and Functions: Roles for G_i and Phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* **57**, 1027-1033

Chalmers, D. T and Behan, D. P. (2002). The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nature Rev. Drug Disc.* **1**, 599-608

Chang, C. and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *TRENDS in Cell Biol.* **11** (11): 537-546

Chen, J., DeVivo, M., Dingus, J., Harry, A., Li, J., Sui, J., Carty, D. J., Blank, J. L., Exton, J. H., Stoffel, R. H., et al. (1995). A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta-gamma subunits. *Science* **268** (5214): 1166-1169

Chen, J., Makino, C. L., Peachey, N. S., Baylor, D. A., Simon, M.I. (1995). Mechanisms of rhodopsin inactivation in vivo as revealed by a COOH-terminal truncation mutant. *Science* **267** (5196): 374-7

Chen, N., Ma, W.-Y., She, Q.-B., Wu, E., Liu, G., Bode, A. M. and Dong, Z. (2001). Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor is involved in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **276** (50): 46722-46728

Chuang, D. M. and Costa, E. (1979). Evidence for internalization of the recognition site of β -adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (2)-isoproterenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3024-3028

Chun, J., Contos, J. J. A. and Munroe, D. (1999). A growing family of receptor genes for lysophosphatidic acid (LPA) and other lyso-phospholipids (LPs). *Cell. Biochem. Biophys.* **30**, 213-242

- Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestins. *Progress in Neurobiol.* **66**, 61-79
- Clark, R. B., Kunkel, M. W., Friedman, J., Goka, T. J. and Johnson, J. A. (1988). Activation of camp-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1442-1446
- Contos, J. J. A., Ishii, I. and Chun, J. (2000). Lysophosphatidic Acid Receptors. *Mol. Pharm.* **58** (6): 1188-1196
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell. A Molecular Approach*. Sinauer Associates Inc., USA.
- Cordeaux, Y and Hill, S. J. (2002). Mechanisms of Cross-Talk between G-Protein-Coupled Receptor. *Neurosignals* **11**: 45-57
- Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Kobilka, B. K. (1988). Molecular cloning and expression of the cDNA of the hamster α_{1B} -adrenergic receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **85** (19): 7159-7163
- Cotecchia S, Bjorklof K, Rossier O, Stanasila L, Greasley P, and Fanelli F. (2002). The alpha1b-adrenergic receptor subtype: molecular properties and physiological implications. *J Recept Signal Transduct Res.* **22** (1-4): 1-16
- Craft, C. M., Whitmore, D. H. and Wiechmann, A. F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.* **269** (6): 4613-4619
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F. and Gulkind, J. S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **369** (6479): 418-420
- Cussac, D., Schaak, S., Denis, C. and Paris, H. (2002). α_{2B} -Adrenergic Receptor activates MAPK via a pathway involving Arachidonic Acid Metabolism, Matrix Metalloproteinases, and Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation. *J. Biol. Chem.* **277** (22): 19882-19888
- Daaka, Y. (2002). Mitogenic action on LPA in prostate. *Biochim. Biophys. Acta* **1582** (265-269)
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della Rocca, G. J., Ferguson, S. S., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273** (2): 685-688
- Daaka, Y., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390** (6655): 88-91
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signaling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379** (6565): 557-560
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. and Ullrich, A. (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* **16** (23): 7032-7044
- Diviani, D., Lattion, A. L. and Cotecchia, S. (1997). Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **272** (45): 28712-28719.
- Diviani, D., Lattion, A. L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J. L. and Cotecchia, S. (1996). Effect of different G protein-coupled receptors on phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **271** (9): 5049-5058

- Dohlman, H. G., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1987). A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* **26** (10): 2657-2664
- Dong, J. and Wiley, H. S. (2000). Trafficking and proteolytic release of epidermal growth factor receptor ligands are modulated by their membrane-anchoring domains. *J. Biol. Chem.* **275** (1): 557-564
- Dong, J., Opreko, L. K., Dempsey, P. J., Lauffenburger, D. A., Coffey, R. J. and Wiley, S. (1999). Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6235-6240
- Doronin, S., Shumay, E., Wang, H. and Malbon, C. C. (2002). Akt Mediates Sequestration on the β_2 -Adrenergic Receptor in Response to Insulin. *J. Biol. Chem.* **277** (17): 15124-15131
- Ferguson, S. S. G. (2001). Evolving concepts in G Protein-coupled receptor Endocytosis: The role in receptor Desensitization and Signaling. *Pharm. Rev.* **53** (1): 1-24
- Ferguson, S. S., Downey, W. E. 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L. and Caron, M. G. (1996). Role of beta arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271** (5247): 363-6
- Ferguson, S. S., Zhang, J., Barak, L. S. and Caron, M. G. (1998). Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci.* **62** (17-18): 1561-1565
- Fonseca, M. I., Button, D. C., Brown, R. D. (1995). Agonist regulation of α_{1B} -adrenergic receptor subcellular distribution and function. *J. Biol. Chem.* **270** (15): 8902-8909
- Freedman, N. J., Liggett, S. B., Drachman, D. E., Pei, G., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1995). Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270** (30): 17953-17961
- Fukushima, N. and Chun, J. (2001). The LPA receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediat.* **64**, 21-32
- Gammeltoft, S. and Kahn, C. R. (1995). Hormone Signaling Via membrane Receptors. In: DeGroot, J. L., ed. *Endocrinology*, Vol. 1, 3rd. W. B. Saunders Company, USA.
- García Sáinz, J. A. (2002). Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. 4^a ed. Fondo de Cultura Económica, México.
- García Sáinz, J. A., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado, J. and Romero-Avila, M. T. (1999b). Protein Kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human α_{1B} -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **385** (2-3): 263-271
- García Sáinz, J. A., Mendlovic, F. and Martínez-Olmedo, M. A. (1985). Effect of phorbol esters on α_1 -adrenergic-mediated and glucagon-mediated actions in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **228**, 277-280
- García Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J. and del Carmen Medina, L. (2000). α_1 -Adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **389**, 1-12
- García Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J. and Villalobos-Molina, R. (1999). α_1 -Adrenoceptors: Subtypes, Signaling, and Roles in Health and Disease. *Arch. Med. Res.* **30**, 449-458

Gether, U. and Kobilka, B. K. (1998). G Protein-coupled Receptors. II. Mechanism of Agonist Activation. *J. Biol. Chem.* **273** (29): 17979-17982

Gilman, A. G. (1987). G Proteins: Transducer of Receptor-generated Signals. *Annu. Rev. Biochem.* **156**, 615-649

Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J. and Piascik, M. T. (1996). Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ. Res.* **78** (5): 737-749

Gräler, M. H. and Goetzl, E. J. (2002). Lysophospholipids and their G protein-coupled receptor in inflammation and immunity. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 168-174

Gros, R., Benovic, J. L., Tan, C. M. and Feldman, R. D. (1997). G-protein-coupled receptor kinase is increased in hypertension. *J. Clin. Invest.* **99**: 2087-2093

Grewal, J. S., Luttrell, L. M. and Raymond, J. R. (2001). G Protein-coupled Receptors Desensitize and Down-regulate Epidermal Growth Factor Receptors in Renal Mesangial Cells. *J. Biol. Chem.* **276** (29): 27335-27344

Gurevich, V. V. and Benovic, J. L. (1993) Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **268** (16): 11628-11638

Habener, J. F. (1995). Cyclic AMP Second Messenger Signaling Pathway. In: DeGroot, J. L., ed. *Endocrinology*, Vol. 1. 3rd ed., W. B. Saunders Co., USA.

Haddock, J. R., Port, J. D., Gelman, M. S. and Malbon, C. C. (1992). Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of β_2 -adrenergic receptor in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **267** (36): 26017-29022

Hama, K., Bando, K., Kakehi, Y., Aoki, J. and Aral, H. (2002). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett.* **523**, 187-192

Hardie, D. G. (1991). *Biochemical Messengers. Hormones, Neurotransmitters and Growth Factors.* Chapman & Hall, USA.

Hargrave, P. A. and McDowell, J. H. (1992). Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J.* **6**, 2323-2331

Hausdorff, W. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* **4**, 281-2889

Hawes, B. E., Luttrell, L. M., van Biesen, T., and Lefkowitz, R. J. (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G $\beta\gamma$ -mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 12133-12136

Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R and Chun, J. (1996). *Ventricular zone gene-1 (vzg-1)* encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell Biol.* **135** (4) 1071-1083

Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G. and Gudermann, T. (1998). Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 8985-8990

Hepler, J. R. and Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci.* **17** (10): 383-387

- Hidalgo, M. and Eckhardt, S. G. (2001). Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Nat. Cancer Inst.* **93** (3): 178-193
- Hieble, J. P. and Bond, R. A. (1994). New directions in adrenoceptor pharmacology. *Trends Pharm. Sci.* **15** (11): 397-399
- Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddes, J. C. and Klagsbrun, M. (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* **251**(4996): 936-939
- Hirata, M., Umata, T., Tsuyoshi, T., Ohnuma, M., Miura, Y., Iwamoto, R. and Mekada, E. (2001). Identification of serum factor inducing ectodomain Shedding of proHB-EGF and studies of noncleavable mutants of proHB-EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 915-922
- Hla, T., Lee, M.-J., Ancellin, N., Paik, J. H. and Kluk, M. J. (2001). Lysophospholipids-Receptor Revelations. *Science* **294**, 1875-1878
- Hokin, M. R. and Hokin L. E. (1953). Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* Vol. 203. In: *Nutr. Rev.* **47** (6): 170-172 (1989)
- Hordijk, P. L., Verlaan, I., van Corven, E. J. and Moolenaar, W. H. (1994). Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of MAP Kinase is mediated by the G1-p12Ras pathway. *J. Biol. Chem.* **269** (1): 645-651
- Horn F., Vriend G., and Cohen F.E. (2001). Collecting and Harvesting Biological Data: The GPCRDB & NucleaRDB Databases. *Nucleic Acid Res.* **29**, 346-349
- Houslay, M. D. (1991). Crosstalk: A pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem.* **195**: 9-27
- Hunter, T. (2000). Signaling-2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127
- Hur, E-U. and Kim, K-T. (2002). G protein-coupled receptor signaling and cross-talk. Achieving rapidity and specificity. *Cell. Sign.* **14**, 397-405
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S. and Mekada, E. (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKC δ are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17** (24): 7260-7272
- Jewell-Motz, E. A., Small, K. M., Theiss, C. T. and Liggett, S. B. (2000). α_{2A}/α_{2C} -Adrenergic Receptor Third Loop Chimera Show That Agonist Interaction with Receptor Subtype Backbone Establishes G Protein-coupled Receptor Kinase Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275** (37): 28989-28993
- Jockers, R., Angers, S., Da Silva, A., Benaroch, P., Strosberg, A. D., Bouvier, M. and Marullo, S. (1999). β_2 -Adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J. Biol. Chem.* **274** (41): 28900-28908
- Kim, D., Lewis, D. L., Graziadei, L., Neer, E. J., Bar-Sagi, D. and Claphan, D. E. (1989). G protein beta gamma-subunits activate the cardiac muscarinic K⁺ channel via phospholipase A2. *Nature* **337** (6207): 557-560
- Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 705-732

- Koch, W. J., Hawes, B. E., Inglese, J., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (1994). Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **269** (8): 6193-6197
- Koenig, J. A. and Edwardson, J. M. (1997). Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **18** (8): 276-287
- Krupinski, J., Lehman, T. C., Frankenfield, C. D., Zwaagstra, J. C. and Watson, P. A. (1992). Molecular diversity in the adenyllylcyclase family. Evidence of eight forms of the enzyme and cloning of type VI. *J. Biol. Chem.* **267** (34): 24858-24862
- Krupnick, J. G., Benovic, J. L. (1998). The role of Receptor Kinases and Arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 289-319
- Kunapuli, P. and Benovic, J. L. (1993). Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (12): 5588-5592.
- Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S.-i., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O. and Katada T. (1997). Heterodimeric Phosphoinositide 3-Kinase Consisting of p85 and p110 β is Synergistically Activated by the β Subunits of G Proteins and Phosphotyrosyl Peptide. *J. Biol. Chem.* **272** (39): 24252-24256
- Laffargue, M., Raynal, P., Yart, A., Peres, C., Wetzker, R., Roche, S., Payastre, B. and Chap, H. (1999). An epidermal growth factor receptor/Gab 1 signaling pathway is required for activation of phosphoinositide 3-kinase by lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **274** (46): 32835-32841
- Langer, S. Z. (1999). History and nomenclature of α_1 -adrenoceptors. *Eur. Urol.* **36** (1) : 2-6
- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P. and Parker, P. J. (1998). Protein Kinase C Isozymes Controlled by Phosphoinositide 3-Kinase Through the Protein Kinase PKD1. *Science* **281**, 242-2045
- Leeb-Lundberg, L. M., Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1987). Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist-promoted desensitization and phosphorylation of alpha 1-adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **262** (7): 3098-3105
- Leeb-Lundberg, L. M., Cotecchia, S., Lomasney, J. W., DeBernardis, J. F., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1985). Phorbol esters promote alpha 1-adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5651-5655
- Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1988). Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **263** (11): 4993-4996
- Lefkowitz, R. J., Hausdorff, W. P. and Caron, M. G. (1990). Role of phosphorylation in desensitization of the β -adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**(5): 190-194
- Lefkowitz, R. J., Pitcher, J., Krueger, K. and Daaka, Y. (1998). Mechanisms of β -adrenergic receptor desensitization and resensitization. In: *Advances in Pharmacology* (Goldstein, D. S., Eisenhofer, G. and McCarty, R. eds.) pp 416-420, Academic Press, San Diego.
- Leserer, M., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2000). Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transactivation. *Life* **49**, 405-409

- Liggett, S. B., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Hnatowich, M. (1991). Coupling of a mutated form of β 2-adrenergic receptor to Gi and Gs. Requirement of multiple cytoplasmic domains in the coupling process. *J. Biol. Chem.* **266** (8): 4816-4821
- Lin, F.-T., Chen, W., Shenoy, S., Cong, M., Exum, S. and Lefkowitz, R. J. (2002). Phosphorylation of β -arrestin2 regulates its function in internalization of β 2-adrenergic receptors. *Biochem.* **41**, 10692-10699
- Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L. and Hung, M. C. (2001). Nuclear localization of EGR receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature Cell Biology.* **3**, 802-808
- Linder, M. E., Ewald, D. A., Miller, R. J. and Gilman, A. G. (1990). Purification and characterization of Go alpha and the three types of Gi alpha after expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256** (14): 8243-8251
- Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codinan, J., Faurell, J.-P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). Receptor-specific Desensitization with Purified Proteins. Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin in the β 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* **267** (12): 5885-8564
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990b). Multiple pathways of rapid β 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* **265** (6): 3202-3209
- Lomasney, J. W., Allen, L. F. and Lefkowitz, R. J. (1995). Cloning and regulation of catecholamine receptor genes. In: *Molecular Endocrinology* (Weintraub, B. D. ed.), pp 115-131. Raven, New York.
- Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1991). Molecular biology of alpha-adrenergic receptors: implications for receptor classifications and for structure-function relationships. *Biochim. Biophys. Acta* **1095** (2): 127-139
- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P. G., Gutkind, J. S. and Wetzker, R. (1997). Linkage of G Protein-Coupled Receptor to the MAPK Signaling Pathway Through PI 3-Kinase γ . *Science* **275**, 394-397
- Loriaux, L. D. 1995. An Introduction to Endocrinology. In: DeGroot, J. L., ed. *Endocrinology*, Vol. 1. 3rd ed., W. B. Saunders Co., USA.
- Lu, Z.-L., Saldanha, J. W. and Hulme, E. C. (2002). Seven-Transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharm. Sci.* **23** (3): 140-146
- Luttrell, L. M., Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Luttrell, D. K. and Lefkowitz, R. J. (1997). G β subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 4637-4644
- Luttrell, L. M., Hawes, B. E., van Biesen T., Luttrell D. K., Lansing, T. J. and Lefkowitz, R. J. (1996). Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbeta gamma subunit mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271** (32): 19443-19450
- Lynch, K. R. (2002). Lysophospholipid receptor nomenclature. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 70-71
- Lynch, C. J., Charest, R., Bocchino, S. B., Exton, J. H. and Blackmore, P. F. (1985). Inhibition of hepatic alpha1-adrenergic effects in binding by phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* **260** (5): 2844-2851

Massagué, J. and Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth-factors. *Ann. Rev. Biotechnol.* **12**, 1-11

Matozaki, T., Hiroyuki, N. and Takai, Y. (2000). Small G-protein networks. Their crosstalk and signal cascades. *Cell. Sign.* **12**, 515-524

Medina, L. C., Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J. A. (2000). Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and α_{1b} -adrenoceptors. *Biochem. J.* **350**, 413-419

Medina, L. C., Vázquez-Prado, J., Torres-Padilla, M. E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz-Muñoz, M. E. and García-Sáinz, J. A. (1998). Crosstalk: phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett.* **422** (2): 141-145

Mons, N., Decorte, L., Jaffard, R. and Cooper, D. M. (1998). Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signaling. *Life Sci.* **62** (17-18): 1647-1652

Moolenaar, W. H. (1995a). Lysophosphatidic acid signaling. *Curr. Op. Cell. Biol.* **7** (2): 203-210

Moolenaar, W. H. (1995b). Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger. *J. Biol. Chem.* **270** (22): 12949-12952

Morris A. J., Rudge S. A., Mahlum C. E. and Jenco J. M. (1995). Regulation of phosphatidylinositol-3-kinase by G protein beta gamma subunits in a rat osteosarcoma cell line. *Mol. Pharmacol.* **48** (3): 532-539

Murayama, T., Tsai, S. C., Adamik, R., Moss, J. and Vaughan, M. (1993). Effects of temperature on ADP-ribosylation factor stimulation of cholera toxin activity. *Biochemistry* **32** (2): 561-566

Murga, C., Fukuhara, S., Gutkind, J. S. (2000). A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J Biol Chem* **275** (16): 12069-12073

Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of Transmembrane Signals. *Cell* **80**, 249-257

Newton, A. C. (1995). Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *J. Biol. Chem.* **270** (5): 28495-28498

Norman, A. W. and Litwack, G. (1997). Hormones. 2nd ed. Academic Press, USA.

Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. and Caron, M. G. (1999). Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated Endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **274** (45): 32248-32257

Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. and Barak, L. S. (2000). Differential affinities of Visual Arrestins, β -Arrestin 1, and β -Arrestin 2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275** (22): 17201-17210

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: a G protein coupled receptor. *Science* **289** (5480): 739-745

Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, V. V., De Kozak, Y., Faure, J. P. and Kuhn, H. (1985). Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science (Wash DC)* **228**: 891-893

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Pierce, K. L., Maudsley, S., Daaka, Y., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2000). Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 1489-1494

Pierce, K. L., Premont, R. T and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-Transmembrane Receptors. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **3**, 639-650

Pierce, K. L., Togo, A., Ahn, S., Field, M. E., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2001). Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor-dependent ERK Activation by G Protein-coupled Receptors. A co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J. Biol. Chem.* **276** (25): 23155-23160

Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Lohse, M. J. (1993). Overexpressions of β -arrestin and β -adrenergic receptor kinase augment desensitization of β 2-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **268** (5): 3201-3208

Pitcher, J., Lohse, M. J., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* **267** (12): 8558-8564

Premont, R.T., Inglese, J., Lefkowitz, R.J., (1995). Protein Kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**, 175-182

Prenzel, N., Fisher, O. M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A. (2001). The Epidermal Growth Factor Receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr.-Rel. Cancer* **8**, 11-31

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1999). EGF receptor Transactivation in plasma membrane of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.* **274**, 884-888

Qwitterer, U. and Lohse, M. J. (1999). Crosstalk between $G\alpha_r$ - and $G\alpha_q$ -coupled receptors is mediated by $G\beta\gamma$ exchange. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 10626-10631

Riese, D. J. 2nd. and Stern, D. F. (1988). Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*. **20** (1): 41-48

Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L. and Krans, H. M. (1971). The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membrane of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.* **246** (6): 1877-1882

Schlessinger, J. (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **103**, 211-225

Schwartz, T. W. (1994). Locating ligand-binding sites in 7TM receptors by protein engineering. *Curr. Op. Biotechnol.* **5** (4): 343-344

Sekura, R. D., Manclark, C. R., Meade, B and Zhang, Y. (1983). Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **258** (23): 14646-41651

Shapiro, M. J. and Coughlin, S. R. (1998). Separate signals for agonist-independent and agonist-triggered trafficking of protease-activated receptor 1. *J. Biol. Chem.* **273** (44): 29009-29014

Sitaramayya, A. and Bunnett, N. W. (1999). Cell Surface Receptors: Mechanisms of Signaling and Inactivation. In: Sitaramayya, A., Ed. *Introduction to Signal Transduction*. Birkäuser, USA.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, William W. and Liao, J. K. (2000). Interaction of oestrogen receptors with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **407**, 538-541

Sonnenburg, E. D., Gao, T. and Newton, A. C. (2001). The Phosphoinositide-dependent Kinase, PDK-1, Phosphorylates Conventional Protein Kinase C Isozymes by a mechanism that is Independent of Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* **276** (48): 45289-45297

Strader, C. D., Fong, T. M., Underwood, D. and Dixon, R. A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101-132

Suzuki, M., Raab, G., Moses, M. A., Fernandez, C. A. and Klagsbrun, M. (1997). Matrix Metalloproteinase-3 releases active Heparin-binding EGF-like Growth Factor by cleavage at a Specific Juxtamembrane site. *J. Biol. Chem.* **272** (50): 31730-31737

Tang, W. K. and Gilman, A. G. (1991). Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* **254** (5037): 1500-1503

Tanoue, A., Koshimizu, T. and Tsujimoto, G. (2002). Transgenic studies of α 1-adrenergic receptor subtype function. *Life Sci.* **71**, 2207-2215

Towes, M. L., Ediger, T. L., Romberger, D. J. and Renard, S. I. (2002). Lysophosphatidic acid in airway function and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 240-250

Trejo, J. and Coughlin, S. R. (1999). The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J. Biol. Chem.* **274** (4): 2216-2224

Ui, M., Okajima, F. and Itoh, H. (1985). ADP-ribosylation of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein (Ni) as a possible mechanism underlying development of beta-adrenergic responses during primary culture of rat hepatocytes. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res.* **19**, 195-205

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Lebermann, T. A., Schlessinger, J. et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309** (5967): 418-425

van Biesen, T., Hawes, B. E., Luttrell, D. K., Krueger, K. M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakae, M., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (1995). Receptor-tyrosine-kinase- and G β γ -mediated MAP kinase activation by a common signaling pathway. *Nature (Lond)* **376**: 781-784

van der Bend, R. L., Brunner, J., Jalink, K., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H. and van Blitterswijk, W. J. (1992). Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J.* **11** (7): 2495-2501

Vanderbeld, B. and Kelly, G. M. (2000). New thoughts on the role of the beta-gamma subunit in G protein signal transduction. *Biochem. Cell Biol.* **78**(5): 537-550

Vázquez-Prado, J., Medina, L. C. and García-Sáinz, J. A. (1997) Activation of Endothelin Receptors Induces Phosphorylation of α _{1b}-Adrenoceptors in Rat-1 Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272** (43): 27330-27337

Vázquez-Prado, J., Medina, L. C., Romero-Ávila, M. T., González-Espinosa C. and García-Sáinz, J. A. (2000). Norepinephrine- and Phorbol Ester-induced Phosphorylation of α _{1b}-Adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.* **275** (9): 6553-6559.

Voet, D. and Voet, J. G. (1990). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, USA.

Vosin, L., Folsy, S., Giasson, E., Lambert, C., Moreau, P. and Meloche, S. (2002). EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C446-C455

von Zastrow, M., and Kobilka, B. K. (1994). Antagonist-dependent and antagonist-independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **269** (28): 18448-18452

Waldo, G. L., Northup, J. K., Perkins, J. P. and Harden, T. K. (1983). Characterization of an altered membrane form of the beta-adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization. *J. Biol. Chem.* **258** (22): 13900-13908

Weiss, E. R., Raman, D., Shirakawa, S., Ducceschi, M. H., Bertram, P. T., Wong, F., Kraft, T. W. and Osawa, S. (1998). The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol. Vis.* **4**: 27

Woessner, J. F. Jr. (2002). MMPs and TIMPs: an historical perspective. *Mol. Biotechnol.* **22** (1): 33-49

Wojtowicz-Praga, S. M.; Dickinson, R. B. and Hawkins, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest. New Drugs* **15**: 61-75

Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F. and Massagué, J. (1992). TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**(6): 1003-1014

Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* **370**, 341-347

Wu, J. and Cunnick, J. M. (2002). Trans-regulation of epidermal growth factor receptor by Lysophosphatidic Acid and G protein coupled receptors. *Biochem. Biophys. Acta* **1582**, 100-106

Wymann, M. P. and Piroia, L. (1998). Structure and function of Phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1436** (1-2): 127-50

Yamada, M., Yahangir, A., Hosoya, Y., Inanobe, A., Katada, T. and Kurachi, Y. (1993). GK and brain G beta-gamma activate muscarinic K⁺ channel through the same mechanism. *J. Biol. Chem.* **268** (33): 24551-24554

Yart, A., Chap., H. and Raynal, P. (2002a). Phosphoinositide 3-kinase in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 107-111

Yart, A., Roche, S., Weizker, R., Laffargue, M., Tonks, N., Mayeux, P., Chap., H. and Raynal, P. (2002b). A Function for Phosphoinositide 3-Kinase β lipid products in Coupling β to Ras Activation in response to Lysophosphatidic Acid. *J. Biol. Chem.* **277** (24): 21167-21178

Zamah, A. M., Delahunty, M., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2002). Protein kinase A-mediated Phosphorylation of the β_2 -Adrenergic Receptor Regulates Its Coupling to G_s and G_i. *J. Biol. Chem.* **277** (34): 31249-31256

Zhang, J., Ferguson, S. S. G., Barak, L. S., Menard, L. and Caron, M. G. (1996). Dynamin and β -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 271 (31): 8302-18305

Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K and Ullrich, A. (1997). Critical role of calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J. Biol. Chem.* 272 (40): 24767-24770

Zwick, E., Hackel, P. O., Prenzel, N. and Ullrich, A. (1999). The EGF receptor as central transducer of heterologous signaling systems. *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (10): 408-412