



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

Desensibilización del receptor  $\alpha_{1D}$   
adrenérgico a través de los receptores  
para: EGF, PDGF e Insulina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:

ERIKA CALVO OCHOA

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ

2008



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.

La presente tesis se realizó en el laboratorio y bajo la tutoría del Dr. Adolfo García Sáinz, en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para su realización se contó con donativos otorgados por DGAPA IN200206 y CONACYT 45837-Q.

Dedico este trabajo y todos los logros obtenidos en mi carrera a las siguientes personas, quienes han marcado e inspirado mi vida profundamente.

A mis papás: Patricia y Javier.

Por su amor inagotable, su apoyo, su confianza y su ejemplo permanente.

Por su incansable determinación de enseñarme  
a destacar siempre en lo que hago.

A mi hermana Ingrid.

Por ser siempre mi compañera. Por demostrarme que todo lo que se  
necesita para alcanzar nuestras metas está dentro de nosotros.

A mi esposo Pablo.

Por su amor incondicional y su apoyo permanente.

Por ser mi inspiración, mi motivación y mi soporte. Por impulsarme  
a alcanzar mis sueños, y por ser parte de ellos.

A mi abuelito Memo.

Por que en donde quiera que esté, comparte este logro conmigo,  
y seguirá siempre con nosotros.

Agradezco a las siguientes personas, cuyo apoyo fue fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Adolfo García Sáinz, por recibirme en su laboratorio. Por su valiosa asesoría, y sus inigualables enseñanzas como científico y como persona. Por su apoyo y confianza, que me permitieron desarrollar un proyecto independiente, lo cual enriqueció sobremanera mi formación profesional y personal.

A los miembros del comité: la Dra. Clorinda Arias, la Dra. María Eugenia Torres, la Dra. Claudia Gómez y la Dra. Marina Macías, por sus valiosos comentarios y aportaciones, los cuales enriquecieron este trabajo.

A mis amigos del laboratorio: Alex, Christian, Rocío, Aurelio y Jean. Por ser buenos amigos, y por todos los momentos que compartimos (y que seguiremos compartiendo). Por su compañía, sus bromas, su apoyo y por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar todos los días.

A Lupita Jiménez, por su arduo trabajo manteniendo el laboratorio en condiciones óptimas para que realicemos nuestro trabajo.

A mis tutores anteriores: el Dr. Enrique Ortega, el Dr. René Drucker, y la Dra. Imelda López; y a sus técnicos académicos: Claudia Garay, Diana Millán y Lorena López. Por su invaluable contribución a mi formación académica, por su paciencia, tiempo, apoyo y por todas las enseñanzas que adquirí dentro de sus laboratorios.

A la coordinación de la LIBB, en particular a la Lic. Cynthia Lima por su gran disposición y por el apoyo para realizar todos los trámites para mi titulación. A Azucena Ayala por su apoyo y buena disposición a lo largo de toda mi carrera.

A los profesores de la carrera que me inspiraron y me motivaron durante sus clases. A aquellos que son un ejemplo para los estudiantes, y que promueven el amor por la Ciencia y la investigación con su trabajo en el aula y en el laboratorio.

Al Instituto de Fisiología Celular, al Instituto de Investigaciones Biomédicas, y finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la gente que trabaja arduamente todos los días en ella para el desarrollo de la Ciencia y de México.

<b>Resumen</b> .....	I
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	II
<b>Lista de figuras y tablas</b> .....	IV

## **Introducción**

I. Receptores Acoplados a Proteínas G	
Generalidades.....	1
Proteínas G.....	3
Efectores de las proteínas G.....	5
II. Mecanismos de regulación de los GPCRs	
Desensibilización.....	8
Fosforilación.....	9
Internalización.....	10
III. Receptores Adrenérgicos	
La adrenalina y la noradrenalina.....	12
Generalidades.....	13
El receptor $\alpha_{1D}$ adrenérgico.....	14
Vía de transducción de señal del receptor $\alpha_{1D}$ adrenérgico.....	16
IV. Receptores con actividad de tirosina cinasa	
Generalidades.....	18
Vía de transducción de los RTKs.....	20
El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y su receptor.....	21
El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y su receptor.....	22
La insulina y su receptor.....	23

## **Antecedentes**

V. Comunicación cruzada entre RTKs y GPCRs	
Generalidades.....	24
Cross-talk entre $\alpha_1$ -AR y RTKs.....	25

## **Justificación y Objetivos**

Justificación del proyecto.....	26
Objetivo General.....	26
Objetivos experimentales.....	27

## **Procedimientos experimentales**

Materiales.....	28
Metodologías.....	28

## **Resultados**

Determinación de Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	30
Ensayos de fosforilación del receptor.....	35
Tratamiento con toxina pertussis (PTX).....	40

## **Discusión y Perspectivas**

Introducción.....	44
Desensibilización del $\alpha_{1D}AR$ mediada por EGF.....	44
Desensibilización del $\alpha_{1D}AR$ mediada por PDGF.....	48
Desensibilización del $\alpha_{1D}AR$ mediada por insulina.....	53
Conclusiones y perspectivas.....	55

<b>Referencias.....</b>	<b>57</b>
-------------------------	-----------

Los datos presentados en esta tesis demuestran que la activación de los receptores de EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas) e Insulina, inducen la desensibilización y fosforilación del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  en fibroblastos Rat-1. Lo anterior se comprobó gracias a ensayos de cuantificación de la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular, y mediante ensayos de fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$ .

Mediante la determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  se estableció que el tratamiento con EGF, PDGF e Insulina modifica la funcionalidad del receptor, manifestada por la disminución significativa de la liberación de este segundo mensajero promovida por su agonista la noradrenalina. Gracias a los ensayos de fosforilación del receptor  $\alpha_{1D}AR$  se determinó que el EGF, el PDGF y la insulina son capaces de fosforilar al receptor de forma dosis-dependiente.

Gracias al uso de inhibidores farmacológicos específicos y de toxina pertussis (PTX), se determinó la participación de las cinasas PKC (Protein Kinase C) y PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), además de una proteína  $G_{\alpha i}$  o un GPCR acoplado a ella en los procesos de desensibilización y fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$ . Se propusieron tres modelos de desensibilización por los diferentes factores probados.



## **Lista de abreviaturas**

---

GPCRS – G protein Coupled Receptors, Receptores Acoplados a Proteínas G  
GTP – Guanosin trifosfato  
GDP – Guanosin difosfato  
cAMP – Adenosin monofosfato cíclico  
cGMP – Guanosin monofosfato cíclico  
DAG – diacilglicerol  
IP<sub>3</sub> – inositol 4-5-trifosfato  
β-AR – Receptor β adrenérgico  
β-ARK – β Adrenergic Receptor Kinase, Cinasa del receptor β-AR  
α-AR – Receptor α adrenérgico  
GRK – G-coupled Receptors Kinase, Cinasa de los GPCRS  
PKC – Protein Kinase C, Proteína Cinasa C  
PKA – Protein Kinase A, Proteína Cinasa A  
PLC – Phospholipase C, Fosfolipasa C  
PIP<sub>2</sub> - Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato  
RTK – Receptor Tyrosine Kinase, Receptores con actividad de tirosina cinasa  
EGF – Epidermal Growth Factor, Factor de crecimiento epidérmico  
PDGF – Platelet-derived Growth Factor, Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
INS – Insulina  
NGF – Nerve Growth Factor, Factor de crecimiento derivado de nervios  
VEGF – Vascular endothelial Growth Factor, Factor de crecimiento de endotelio vascular  
FGF – Fibroblast Growth Factor, Factor de crecimiento derivado de fibroblastos  
IGF-I – Insulin-like Growth Factor 1, Factor de crecimiento similar a la insulina 1  
SH2/3 – Src Homology Domain 2/3, Dominio de homología con Src 2 y 3  
PH – Pleckstrin Homology, Homología a pleckstrina  
MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase, Cinasas activadas por mitógenos  
PI3K – Phosphoinositide-3-kinase, Fosfoinosítido 3 cinasa  
ERK – Extracellular Regulated Kinase, Cinasa regulada por estímulo extracelular  
JNK – Janus N-terminal Kinase, Cinasa homóloga al N-terminal de Janus  
PKB/Akt – Protein Kinase B, Proteína Cinasa B  
TGFα – Transforming Growth Factor α, Factor de crecimiento transformante α  
HB-EGF – Heparin binding EGF, EGF unido a la heparina  
IRS-1 – Insulin Receptor Substrate - 1, Substrato del receptor de insulina 1

ET<sub>A</sub> – Receptor de endotelina A  
LPA<sub>1</sub> – Receptor de ácido lisofosfatídico 1  
AT<sub>1</sub> – Receptor de angiotensina  
S1P – Receptor de esfingosina-1-fosfato  
D<sub>2</sub> – Receptor de Dopamina 2  
NA – Noradrenalina  
STAU – estaurosporina  
BIM – bisindolilmaleimida I  
WORT – wortmanina  
LY – LY294002  
PTX – Toxina pertussis

### Introducción

- Fig. 1.1. Modelo de la estructura de los GPCRs
- Fig. 1.2. Estructura de los GPCRs
- Fig. 1.3. Modelo de activación de los GPCRS
- Fig. 1.4. Estructura de las proteínas G
- Fig. 2.1. Modelo de fosforilación de los GPCRs
- Fig. 2.2. Modelo de internalización de los GPCRs
- Fig. 3.1. Biosíntesis de las catecolaminas
- Fig. 3.2. Vía de transducción del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$
- Fig. 4.1. Estructura de los receptores con actividad de tirosina cinasa (clase I y II) y modelo de activación
- Tabla 1. Clasificación de las proteínas G y sus efectores
- Tabla 2. Clasificación de los receptores adrenérgicos

### Resultados

- Fig. 1. Determinación de  $Ca^{2+}$  intracelular
- Fig. 2. Gráfica comparativa de la determinación de  $Ca^{2+}$  intracelular
- Fig. 3. Curva dosis-respuesta en determinación de  $Ca^{2+}$
- Fig. 4. Determinación de  $Ca^{2+}$  con inhibidores de la PKC y la PI3K
- Fig. 5. Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR
- Fig. 6. Curva dosis-respuesta de fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR
- Fig. 7. Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR con inhibidores de la PKC y la PI3K
- Fig. 8. Determinación de  $Ca^{2+}$  intracelular con PTX
- Fig. 9. Determinación de  $Ca^{2+}$  con PTX
- Fig. 10. Gráfica comparativa de la determinación de  $Ca^{2+}$  con PTX
- Fig. 11. Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR con PTX
- Fig. 12. Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR por LPA

## **Discusión y Perspectivas**

Fig. 1. 1er. modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del EGFr

Fig. 2. 2do. modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del EGFr

Fig. 3. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del PDGFr I

Fig. 4. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del PDGFr II

Fig. 5. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del PDGFr III

Fig. 6. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del PDGFr III

Fig. 7. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del receptor de insulina

# **Introducción**

---

# I. Receptores Acoplados a Proteínas G

---

## Generalidades

La comunicación celular, necesaria para el mantenimiento de la homeostasis y las respuestas coordinadas en organismos multicelulares, requiere de varios elementos indispensables para llevarse a cabo: el primero de ellos es la señal, generalmente química, emitida por alguna célula del sistema o generada por el ambiente; el segundo es un receptor de naturaleza proteica, el cual reconoce de manera específica una señal determinada, y por último, un sistema de transducción de la señal, el cual permite que una molécula determinada unida a su receptor tenga una respuesta biológica específica. Dentro de este contexto, es evidente que los receptores tienen un papel imprescindible en la comunicación celular, y su importancia reside en la especificidad que tienen por la(s) molécula(s) que reconocen.

Existen varias familias de receptores agrupadas por sus características estructurales, por su ubicación celular y por las moléculas que reconocen. La clasificación actual de las superfamilias de receptores incluye a los receptores con actividad enzimática: cinasas de tirosina y serina/treonina, con actividad de guanilil ciclasas; receptores tipo canal; receptores acoplados a proteínas G y receptores intracelulares.

En la presente tesis se profundizará en el estudio de un receptor perteneciente a la superfamilia de los Receptores Acoplados a Proteínas G, o de siete dominios transmembranales: el receptor  $\alpha_{1D}$  adrenérgico.

Los Receptores Acoplados a Proteínas G, GPCRs por sus siglas en inglés, son la superfamilia más grande y diversa de receptores en mamíferos. En el humano más del 1% del genoma codifica para GPCRs (Takeda et al., 2002; Fredriksson et al., 2003).

Los receptores de siete dominios transmembranales fueron descritos a mediados de los 80s por varios grupos que estudiaban una proteína de membrana de *S. cerevisiae* que reconocía feromonas sexuales. Gracias a perfiles de hidrofobicidad se describió que estas proteínas están embebidas en la membrana citoplasmática debido a siete dominios transmembranales, conectados por tres asas citoplásmicas y tres asas extracelulares; un extremo amino terminal extracelular, y un extremo carboxilo terminal intracelular (Jenness et al., 1983; Burkholder & Hartwell 1985; Nakayama et al., 1985; Hagen et al., 1986) (Fig. 1.1).

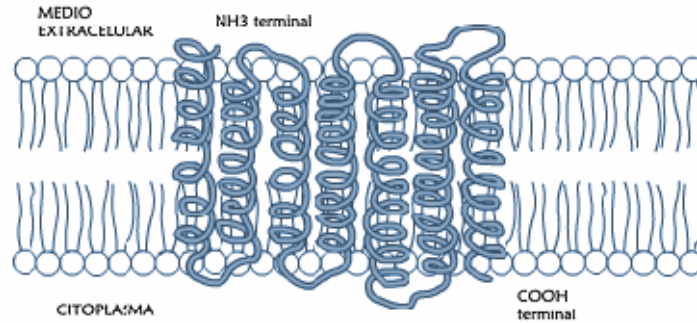


Fig. 1.1 Modelo de la estructura de los GPCRs - Se muestran los siete dominios transmembranales del receptor, embebidos en la membrana citoplasmática, sus seis asas hidrofílicas y sus extremos terminales. Modificada de Bensaccount, 2004.

Sin embargo, la estructura tridimensional de estos receptores se conoció hasta el 2000 gracias al trabajo del grupo de Miyano (Palczewski et al., 2000), quien describió la estructura atómica de la rodopsina, uno de los GPCRs más estudiados (Fig. 1.2).

La función de los GPCRs en las células de mamíferos es diversa. Se encuentran distribuidos en prácticamente todos los tejidos y reconocen estímulos como la luz, neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, iones, feromonas, lípidos, entre otros; estas características los convierten en excelentes modelos de estudio para comprender procesos celulares fundamentales y también los vuelve blancos terapéuticos importantísimos.

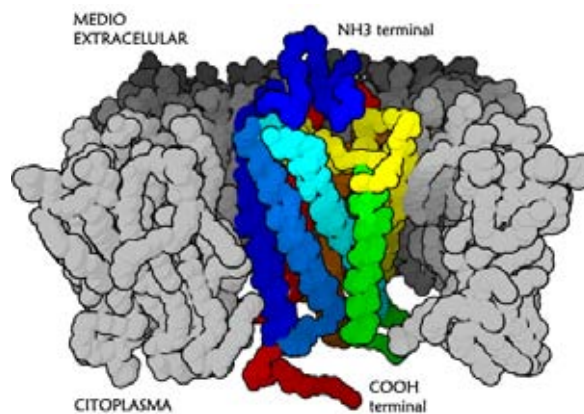


Fig. 1.2. Estructura de los GPCRs - Se muestran en diferentes colores los siete dominios transmembranales del receptor, embebidos en la membrana citoplasmática, mostrada en gris. Modificada de Bensaccount, 2007. Basado en el archivo 1hzx de PDB y en los coordinados lipídicos de Heller/Schaefer/Schulten.

Los GPCRs transducen, o median, su señal gracias a la activación de proteínas G heterotriméricas contiguas a sus dominios intracelulares. Estas proteínas están formadas por tres subunidades independientes conocidas como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

## **Proteínas G**

A principios de los 70s el grupo de Rodbell describió que los nucleótidos de guanina, GTP y GDP, eran necesarios para la activación de la adenilil ciclasa en respuesta a la estimulación del receptor de glucagon y también para la unión del agonista al receptor (Rodbell et al., 1971). Estos datos ayudaron a proponer la existencia de una molécula transductora de la señal entre el receptor y el efector (Rodbell, 1974; Rodbell, 1975). En 1974 Pfeuffer y Helmreich encontraron esta molécula, una proteína capaz de promover los efectos celulares del receptor activado, que requería de la unión de GTP (Pfeuffer & Helmreich, 1974). Este grupo demostró también que la proteína transductora, conocida como N, se unía tanto al receptor como al efector, y que se regulaba mediante actividad de GTPasa (Schlegel et al., 1979). Adicionalmente, describió que la proteína constaba de varias subunidades y que éstas regulaban el estado de activación o inactivación del receptor y de la adenilil ciclasa (Nielsen et al., 1980).

En 1980, Gilman reportó que esta proteína se encontraba como heterodímero y que la subunidad llamada  $\alpha$  contenía un sitio de unión a GDP y actividad de GTPasa; ésta se encontraba unida a una subunidad  $\beta$  (Northup et al., 1980). En 1984 se descubrió la subunidad  $\gamma$  y se detallaron los componentes de las proteínas G heterotriméricas como elementos transductores de la señal entre el receptor y el efector (Hildebrandt 1984).

En 1987, el grupo de Gilman describió en una serie de manuscritos la forma en la cual las proteínas G se activan: reportó que la subunidad  $G\alpha$  tenía unido GDP en estado inactivo, que era activada al estimular al receptor con su agonista y que esta activación promovía el intercambio de GDP por GTP. Adicionalmente, describió que la unión de GTP promovía una disociación de las subunidades  $G\beta\gamma$ , permitiendo que tanto  $G\alpha$  como  $G\beta\gamma$  reconozcan proteínas específicas para transducir la señal. También reportó que la subunidad  $G\alpha$  estaba anclada a la membrana por un ácido mirístico y que todo el proceso de activación de las proteínas G por el receptor ocurría a nivel de la membrana plasmática. Para inactivarse, la subunidad  $G\alpha$  hidroliza el GTP



a GDP, lo que permite la reasociación de las tres subunidades de la proteína G (Higashijima et al., 1987; Higashijima et al., 1987; Higashijima et al., 1987; Buss et al., 1987). Por estos descubrimientos de las proteínas G y de su rol como transductoras de señales, Gilman y Rodbell fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología en 1994 (Fig. 1.3).

A partir de la descripción de la activación de las proteínas G y de la clasificación de los receptores acoplados a ellas, la información disponible en la literatura sobre este sistema es inmensa; se han estudiado a detalle sus procesos de activación, regulación y su importancia fisiológica. Un hallazgo importante en los últimos años fue la obtención de su estructura tridimensional. En 1996 el grupo de Sigler obtuvo la estructura atómica de las tres subunidades de las proteínas G (Lambright, 1996) (Fig. 1.4).

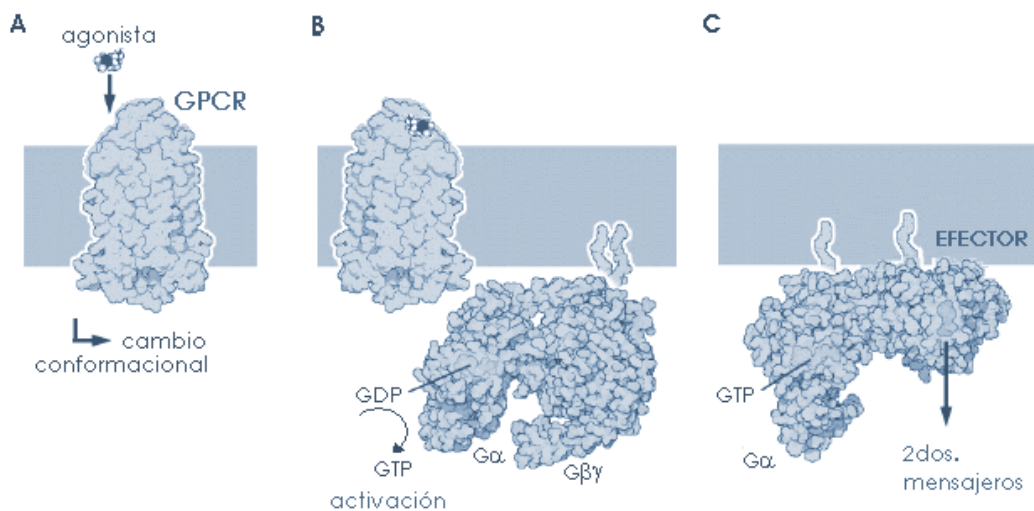


Fig. 1.3. Modelo de activación de los GPCRS. A: Como consecuencia de la estimulación del receptor con su agonista, éste sufre un cambio conformacional. B: El cambio conformacional del receptor es reconocido por las proteínas G, promoviendo el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$ . C: El intercambio por GTP activa a las proteínas G, promoviendo la disociación o el cambio conformacional de la subunidad  $G\alpha$  y permitiendo su asociación con el efector membranal, produciendo segundos mensajeros como consecuencia.

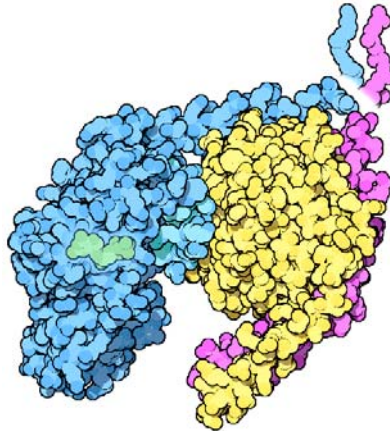


Fig. 1.4. Estructura de las proteínas G - Se muestra en azul la subunidad  $\alpha$  con GTP, en verde; la subunidad  $\beta$  en amarillo y la subunidad  $\gamma$  en rosa. Modificada de David S. Goodsell, 2004. Basado en el archivo 1gg2 de PDB.

Posteriormente, el grupo de Bouvier publicó manuscritos que suscitaron una nueva controversia sobre las proteínas G. Se propuso que el heterotrímero  $G\alpha\beta\gamma$  se encuentra asociado al receptor constitutivamente, y que al estimularlo con el agonista las subunidades no se disocian, sólo cambian su conformación. Esta propuesta es novedosa y cambió el paradigma de la activación establecido desde los años 80s (Galés et al., 2005; Galés et al., 2006).

Sin embargo, la activación de las proteínas G debida a la unión de un ligando a su receptor no tendría sentido funcional sin proteínas que puedan reconocer esta activación para generar una señal específica. Estas proteínas se conocen como efectores y la gran variedad de respuestas mediadas por los GPCRs se deben a su activación.

## **Efectores de las proteínas G**

El descubrimiento de las proteínas G las involucró inmediatamente con su primer efector conocido: la adenilil ciclasa. En los trabajos de Rodbell, Pfeuffer y Helmreich se les relacionó directamente con la activación de la adenilil ciclasa y la producción de cAMP, a pesar de no estar descritas como proteínas G. Se conocía también que la adenilil ciclasa no sólo se activaba, sino también se inhibía en respuesta a hormonas (Rodbell et al., 1971; Rodbell, 1980; Cooper, 1982; Londos et al 1981; Hildebrandt et al., 1983). Después del descubrimiento de las proteínas G, se

determinó que la dualidad de la respuesta de la adenilil ciclasa se debía a la activación de diferentes tipos de proteínas G: una que activaba y otra que inhibía la producción de cAMP (Lad et al., 1980).

Para 1984 se habían designado como Gs y Gi a las subunidades G $\alpha$  que activaban (Stimulatory) e inhibían (Inhibitory) a la adenilil ciclasa. Una característica distintiva de ambas proteínas G es que pueden ser identificadas con el uso de dos toxinas distintas. La proteína Gi (o Ni, como era conocida anteriormente) es inactivada por la toxina pertussis, llamada así por la bacteria *Bordetella pertussis* que la produce, debido a que ésta la ADP-ribosila e inactiva (García-Sáinz, 1981; Katada & Ui, 1981). La proteína Gs es ADP-ribosilada por la toxina del cólera obtenida de la bacteria *Vibrio cholerae*, modificación que la mantiene en un estado activo constitutivo (Cassel & Selinger, 1977).

En 1982 se vinculó una proteína G a un receptor no acoplado a la adenilil ciclasa (Goodhart et al., 1982); sin embargo, fue en 1984 cuando Sternweist y Robishaw descubrieron una proteína G no acoplada a la adenilil ciclasa y la llamaron Go (Sternweist et al., 1984).

En 1987 se describió una conexión entre Go (Gq actual) y el aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Hescheler et al., 1987); pero fue hasta 1990 cuando se vinculó directamente a Gq con el sistema de recambio de fosfoinosítidos/Ca<sup>2+</sup> descrito a mediados de los 80s, y se describió que éste era insensible a la toxina pertussis (Moriarty et al., 1990).

Desde entonces se sabe que la especificidad de las proteínas G se debe a la subunidad  $\alpha$  y se han descrito subunidades nuevas que activan efectores distintos. Se conocen 16 genes que codifican para subunidades  $\alpha$  en mamíferos y algunos de éstos se expresan sólo en células sensoriales muy particulares (Simon et al., 1991). En la Tabla 1 se muestra la clasificación actual de las familias de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G y sus efectores.

Además de la variedad de las subunidades  $\alpha$ , se conocen también subtipos de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . Se conocen 5 subunidades  $\beta$  y 12 subunidades  $\gamma$  (Hurley, 1990; Cansen et al., 2000). Se sabe que éstas pueden formar casi cualquier combinación de dímeros  $\beta\gamma$  pero no se han encontrado todas las posibles combinaciones *in vivo*

(Schmidt et al., 1991; Simonds et al., 1991; Graber et al., 1992; Dietrich et al., 1992; Kristi et al., 2004). También se han iniciado estudios sobre la unión de estos dímeros con subunidades  $\alpha$  específicas en condiciones celulares particulares, pero es un campo aún en desarrollo (Birnbauer et al., 1992; Graf et al., 1992; Goel et al., 2004).

Los dímeros  $\beta\gamma$  también se asocian a diversos efectores y tienen funciones señalizadoras independientes de  $G\alpha$  (Pfaffinger, 1985; Neer et al 1988; Camps et al., 1992; Clapham et al., 1993; Reuveny et al., 1994; Barber et al., 2007).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas G y sus efectores.

Proteína $G\alpha$	Efeotor	Consecuencia de la activación
$G_s$	$\uparrow$ Adenilil ciclasa	Producción de cAMP
$G_i$	$\downarrow$ Adenilil ciclasa	Inhibición de la producción de cAMP
$G_{q/11}$	$\uparrow$ Fosfolipasa C $\beta$	Producción de diacilglicerol (DAG) e inositol 4-5-trifosfato ( $IP_3$ ), liberación de $Ca^{2+}$
$G_{12/13}$	GTPasas Rho	Polimerización de actina, movimiento
$G_t$	Transducina	Degradación de cGMP

## **II. Mecanismos de regulación de los GPCRs**

---

En todo proceso celular se requiere de una regulación fina de sus componentes y mecanismos de acción para que éste pueda ser controlado y específico, y los GPCRs no son la excepción. Al proceso de regulación de estos receptores se le conoce como desensibilización, la cual implica la disminución de la capacidad para responder a su ligando.

### **Desensibilización**

La regulación funcional de los GPCRs tiene consecuencias fisiológicas fundamentales, debido a que una sobreestimulación de estos receptores podría tener efectos adversos sobre la célula o incluso sobre el organismo. Los mecanismos de desensibilización de los GPCRs parecen ser universales a pesar de la diversidad de ligandos y respuestas en las que intervienen.

Fue a mediados de los 70s cuando se acuñó el término de desensibilización para referirse a la pérdida de la capacidad de responder al ligando de los receptores, y uno de los grupos líderes en esta rama es el de Lefkowitz, quien ha estudiado en el modelo del receptor  $\beta$ -adrenérgico los mecanismos que regulan su respuesta. En 1975 describió que la actividad de la adenilil ciclasa mediada por el receptor  $\beta$ -AR disminuía después de un estímulo constante del agonista, y que esta disminución se debía a la reducción de los sitios de unión al ligando disponibles en la membrana (Mukherjee et al., 1975). A partir de estos descubrimientos se clasificó como desensibilización homóloga a aquella disminución de la respuesta de un receptor debida a la estimulación constante de su agonista (Su et al., 1976; Su et al., 1976; Clark et al., 1979).

Paralelamente, se reportó también que la activación de receptores distintos regulaba negativamente la actividad de la adenilil ciclasa mediada por los receptores de prostaglandinas y adrenalina. A este tipo de desensibilización se le llamó heteróloga y se definió como la disminución de la respuesta de un receptor mediada por moléculas distintas a su agonista (Clark et al., 1979; Harden, 1983).

## Fosforilación

Los primeros reportes de fosforilación de GPCRs datan de principios de los 70s y el modelo de estudio fue la rodopsina (Kuhlen & Dreyer, 1972). En 1978 se descubrió que esta fosforilación era específica de la cinasa de rodopsina en respuesta al estímulo visual (Shichi & Sommers, 1983) y en 1983 se demostró que la fosforilación de los receptores como consecuencia de la estimulación con el agonista llevaba a su desensibilización, y si ésta era revertida con el uso de fosfatasas, el receptor seguía siendo funcional (Stadel et al., 1983; Sibley et al., 1984; Strulovici et al., 1984; Sibley et al., 1986; Yang et al., 1988).

En 1986 se descubrió una cinasa capaz de fosforilar al receptor  $\beta$ -AR sólo cuando éste era activado con su agonista. Esta cinasa fue nombrada  $\beta$ -ARK como abreviación de  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase. También se describió que la  $\beta$ -ARK era capaz de fosforilar al receptor  $\alpha_1$ -AR, lo que sugería que esta cinasa no era exclusiva de un solo receptor (Benovic et al., 1985; Benovic et al., 1986; Benovic et al., 1987). A partir de 1989 se descubrieron siete genes pertenecientes a la misma familia de la  $\beta$ -ARK, y se clasificó a estas cinasas como GRKs, por sus siglas en inglés: G-coupled Receptors Kinases (Benovic et al., 1989, Benovic et al., 1991; Ambrose et al., 1993; Kunapoli & Benovic, 1993; Benovic & Gomez, 1993; Haribau & Sinderman, 1993).

Paralelamente, a mediados de los 80s se determinó la participación de cinasas activadas por segundos mensajeros en la desensibilización homóloga y heteróloga de receptores adrenérgicos. Se encontró que las cinasas PKC (Protein Kinase C) y PKA (Protein Kinase A) eran capaces de fosforilar al receptor  $\alpha_1$ -AR, que activa la vía de  $Ca^{2+}$  e  $IP_3$ , y al  $\beta_2$ -AR que activa la vía de cAMP, respectivamente. Esto demostró que cinasas activadas por la misma vía de transducción del receptor eran capaces de fosforilarlo y desensibilizarlo de manera específica, como un sistema de retroalimentación (Corvera & García-Sáinz, 1984; Benovic et al., 1985; Bouvier et al., 1986).

El modelo de fosforilación de los GPCRs propuesto por Lefkowitz es el siguiente: al ser ocupado por el agonista, las proteínas G se disocian en subunidades  $G_\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , lo que deja un sitio de reconocimiento del receptor para una GRK., la cual es capaz de fosforilar al receptor en serinas y/o treoninas para desensibilizarlo. Además de las GRKs, las cinasas activadas por segundos mensajeros como la PKC y la PKA son

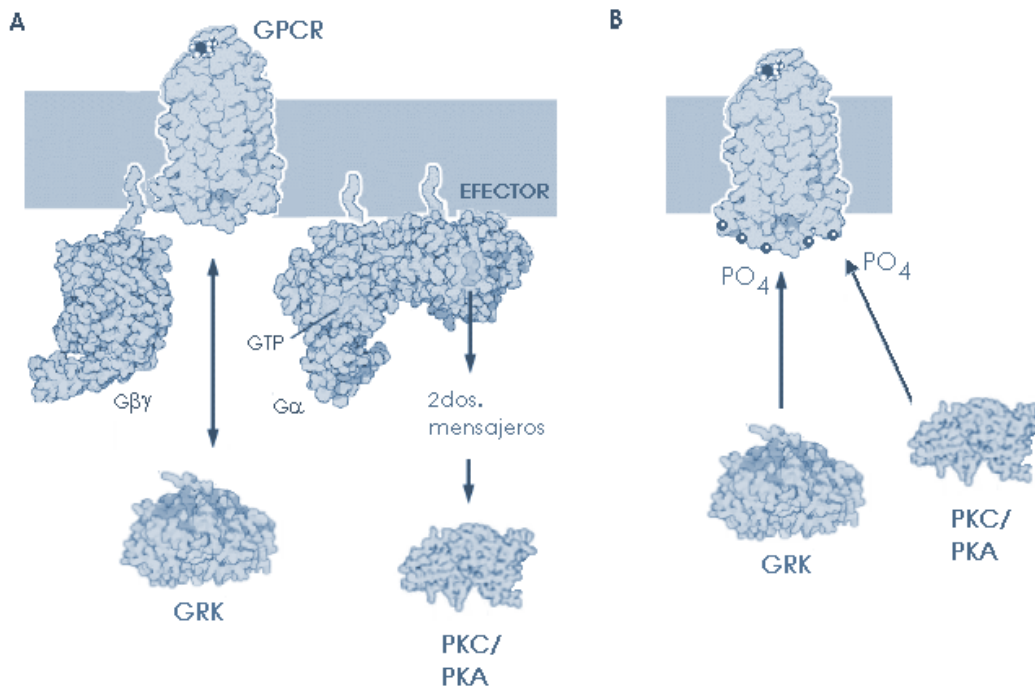


Fig. 2.1. Modelo de fosforilación de los GPCRs. A: Como consecuencia de la activación del receptor, la disociación de las subunidades de las proteínas G deja expuesto un sitio de reconocimiento para las GRKs. Paralelamente, cinasas activadas por segundos mensajeros, como PKC y PKA son activadas. B: Tanto GRKs como PKC/PKA activadas fosforilan al receptor en residuos de serina y treonina.

capaces también de fosforilar al receptor después de ser activadas, creando un asa de autorregulación (Fig. 2.1). Estas cinasas pueden ser activadas también por otros receptores, mediando así una desensibilización heteróloga al fosforilar al receptor.

## Internalización

También en los años 80s se descubrió que los receptores después de ser fosforilados son internalizados en vesículas cubiertas de clatrina, lo que ocasiona la pérdida de sitios de unión al ligando en la membrana, y por lo tanto su función (Chiang et al., 1980; Harden et al., 1980; Strasser et al., 1984; Strasser et al., 1985; Hertel et al., 1986; Heuser & Anderson, 1989; Heuser, 1989).

El grupo de Kühn descubrió que la desensibilización de la rodopsina en su estado fosforilado requería de la unión de una proteína conocida como arrestina (Wilden et al., 1986). Se purificó ésta y se demostró que era capaz también de unirse al receptor  $\beta$ -AR fosforilado para su desensibilización (Benovic, et al., 1987); sin embargo, hasta

1990 pudo clonarse el gen del homólogo de la arrestina visual para el receptor  $\beta$ -AR, el cual fue llamado  $\beta$ -arrestina; sus funciones eran similares a las observadas para la rodopsina (Lohse et al., 1990).

Lefkowitz propuso un modelo más completo del proceso de desensibilización de los GPCRs en el cual, al ser activados por su ligando, transducen su señal gracias a las proteínas G y son fosforilados tanto por GRKs como por cinasas activadas por segundos mensajeros. La fosforilación del receptor permite la asociación de  $\beta$ -arrestinas, lo cual promueve la formación de vesículas cubiertas de clatrina, ocasionando la invaginación de éstas y con ello la internalización del receptor para su reciclaje o degradación (Premont et al., 1995; Lefkowitz 1998, Hall & Lefkowitz, 2003; Drake et al., 2006) (Fig. 2.2)

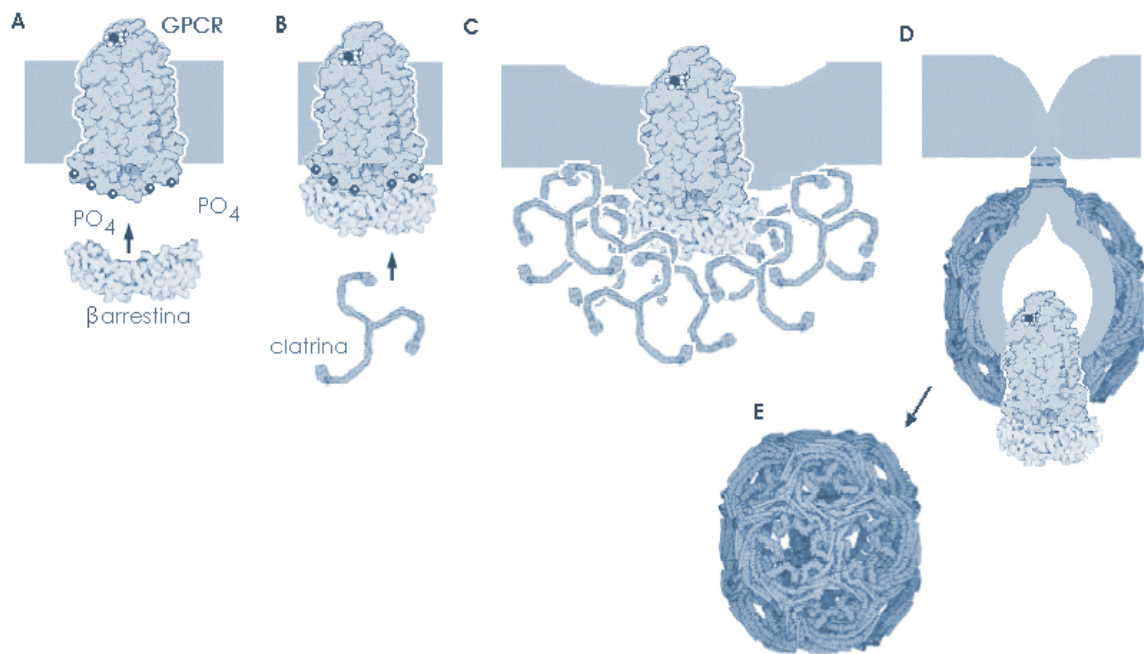


Fig. 2.2. Modelo de internalización de los GPCRs. A: El receptor previamente fosforilado es reconocido por la  $\beta$ -arrestina. B: La  $\beta$ -arrestina se asocia al receptor fosforilado, lo que promueve el reclutamiento de moléculas de clatrina. C: La clatrina comienza a asociarse alrededor del receptor, la  $\beta$ -arrestina y la membrana plasmática, comenzando a formar una invaginación en ésta. D: La invaginación en la membrana cubierta de clatrina se convierte en una vesícula que se internaliza. E: Vesícula de clatrina internalizada. El destino del receptor contenido en esta vesícula será de degradación o reciclaje.



### III. Receptores Adrenérgicos

#### La adrenalina y la noradrenalina

En 1893 y 1895, George Oliver y Napoleón Cybulski, respectivamente, demostraron los efectos fisiológicos de una sustancia obtenida de preparaciones de las glándulas suprarrenales. Sin embargo, fue hasta 1897 cuando un bioquímico, John Abel, la llamó “epinefrina” (*epinephrine*). Utilizó este nombre por las palabras griegas: *epi* -sobre y *nephros* -riñón.

En 1901, después de una visita al laboratorio de Abel, Jokichi Takamine logró obtener un extracto más puro derivado de la glándula adrenal, con propiedades farmacológicas más impresionantes que las preparaciones de Abel. Takamine la patentó como “adrenalina” (*adrenalin*), derivado del latín: *ad* –sobre y *renes* –riñón. Éste fue entonces el nombre más común para designar a una de las primeras hormonas descubiertas (Aronson, 2000). Sin embargo, estos extractos suprarrenales no sólo contenían adrenalina, sino también noradrenalina.

Estas hormonas: la adrenalina, o epinefrina, y la noradrenalina, o norepinefrina, son catecolaminas derivadas del aminoácido tirosina. El paso final de su biosíntesis es la hidroxilación de la dopamina, en el caso de la noradrenalina, y la metilación de la noradrenalina, en el caso de la adrenalina (Fig.3.1).

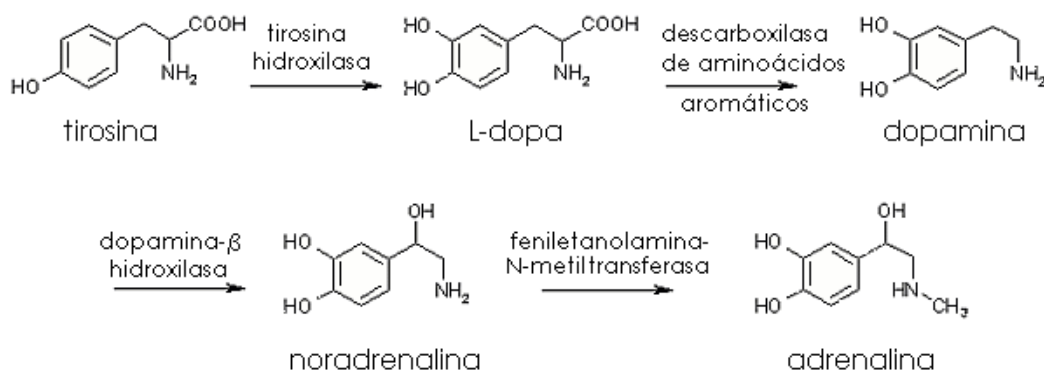


Fig. 3.1. Biosíntesis de las catecolaminas. En la figura se muestran los precursores bioquímicos y las enzimas involucradas en la biosíntesis de la adrenalina y la noradrenalina.

Se ha dividido el estudio de las acciones fisiológicas de la adrenalina y la noradrenalina dependiendo de las células que las sintetizan y su forma de liberación. Se consideran hormonas cuando son sintetizadas en las células cromafines de la médula adrenal y son vertidas al torrente sanguíneo. Por otro lado, se consideran neurotransmisores cuando son sintetizadas por neuronas adrenérgicas y son liberadas en vesículas hacia la sinapsis.

Las acciones fisiológicas de las hormonas adrenales son conocidas como de “pelea o huida”, debido a que preparan al organismo para lidiar con situaciones de peligro. Algunas de las más importantes incluyen: el aumento de la frecuencia cardíaca y la presión arterial, la vasoconstricción en la piel y en el sistema gastrointestinal, la vasodilatación en el músculo esquelético, el incremento de glucosa en la sangre debido a la glucogenólisis y gluconeogénesis en hígado y a la lipólisis en tejido graso, entre otros.

Todas las acciones de la adrenalina y de la noradrenalina son debidas a la estimulación de los receptores adrenérgicos. Estos receptores, como se mencionó anteriormente, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, o GPCRs.

## **Generalidades**

A principios del siglo XX varios fisiólogos estudiaron el efecto de una sustancia liberada en nervios estimulados, con propiedades “parecidas a las de la adrenalina”. El estudio de esta sustancia suscitó controversia durante décadas, debido a las acciones estimuladoras e inhibitorias que se observaban en diferentes tejidos. Por esta razón, se creía que esta sustancia no era adrenalina sino algún análogo (Barger & Dale, 1910; Cannon & Rosenblueth, 1933; Cannon & Rosenblueth, 1935; Ruffolo, 1983).

Un trabajo pionero fue el de Henry Dale, quien consideró que esta sustancia era en realidad adrenalina, y que los diversos efectos que producía se debían a la existencia de tres “sustancias receptoras” para ella: una estimuladora, una inhibitoria, y una mezcla de las dos. Adicionalmente, reportó los efectos de la ergotoxina como antagonista de la adrenalina en el sistema vascular, lo cual lo llevó a suponer que otras sustancias podían tener efectos antagónicos sobre el mismo receptor (Dale, 1906). Tiempo después, en 1948, Raymond Ahlquist describió dos tipos de receptores de adrenalina: los excitatorios o “ $\alpha$  adrenotrópicos” y los inhibitorios o “ $\beta$

adrenotrópicos”. Ahlquist probó diferentes catecolaminas y clasificó los órdenes de potencia de activación de éstas sobre los receptores adrenérgicos. También identificó la existencia de cada tipo de receptor en diferentes órganos y tejidos (Ahlquist et al., 1948).

A pesar de la importancia del trabajo de Ahlquist, tuvieron que pasar más de diez años para que se aceptara su propuesta. Fue gracias al descubrimiento de bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos específicos que se comenzó a considerar la clasificación de Ahlquist. Para 1967 se habían identificado varios subtipos de receptores  $\beta$ -AR (Lands, et al., 1967; Furchgott, et al., 1967; Ahlquist et al., 1968). En la década siguiente se comenzaron a clasificar también los diferentes receptores  $\alpha$ -AR (Starke et al., 1971; Enero, 1972; Langer et al., 1977; Berthelsen & Pettinger, 1977). En 1980 Fain y García-Sáinz definieron la clasificación en tres subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$  (Fain & García-Sáinz, 1980).

Hasta mediados de los 80s la identidad de los receptores adrenérgicos era desconocida. En 1986 el grupo de Lefkowitz clonó por primera vez el cDNA del receptor  $\beta_2$ -AR y gracias a la secuencia de aminoácidos obtenida se encontró homología con la rodopsina, un GPCR (Dixon, et al., 1986; Kobilka et al., 1987). Este hallazgo fue fundamental para la clasificación de los receptores adrenérgicos dentro de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, y para la clonación y caracterización de los nueve subtipos que hoy se conocen.

La clasificación actual de los receptores adrenérgicos incluye tres tipos:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ , y nueve subtipos, clasificados por homología de secuencia de aminoácidos y de acuerdo al sistema de transducción preferencial que activan. En la Tabla 2 se muestra esta clasificación.

### **El receptor $\alpha_{1D}$ adrenérgico**

Los receptores  $\alpha_1$ -AR fueron clasificados por primera vez en modelos neuronales, gracias a reportes de heterogeneidad de la población de receptores  $\alpha$  las terminales sinápticas (Brown & Gillespie, 1957). Se describió que los receptores adrenérgicos postsinápticos eran excitatorios, o  $\alpha_1$ , y los presinápticos, inhibitorios, o  $\alpha_2$  (Starke, et al., 1971; Enero et al., 1972).

Tabla 2. Clasificación de los receptores adrenérgicos.

Receptor	Potencia de agonistas	Efecto fisiológico	Proteína G $\alpha$ a la que se acopla	Agonistas	Antagonistas
$\alpha_{1A}$ , $\alpha_{1B}$ , $\alpha_{1D}$	noradrenalina > adrenalina > isoprenalina	Contracción de músculo liso, vasoconstricción de venas	G $_{q/11}$	noradrenalina fenilefrina metoxamina cirazolina	fenoxibenzamina fentolamina prazosina tamsulosina terazosina
$\alpha_{2A}$ , $\alpha_{2B}$ , $\alpha_{2C}$	adrenalina > noradrenalina > isoprenalina	Contracción de músculo liso de esfínteres	G $_i$	clonidina lofexidina xilazina tizanidina guanfacina	yohimbina
$\beta_1$	isoprenalina > noradrenalina > adrenalina	Contracción de músculo cardíaco, lipólisis	G $_s$	noradrenalina isoprenalina dobutamina	metoprolol atenolol
$\beta_2$	isoprenalina > adrenalina > noradrenalina	Relajación de músculo cardíaco, de esfínteres, arterias	G $_s$	salbutamol bitolterol formoterol isoproterenol levalbuterol metaproterenol	butoxamol propranolol
$\beta_3$	isoprenalina > noradrenalina = adrenalina	Lipólisis en adipositos	G $_s$		

A mediados de los 80s el grupo de García-Sáinz propuso la existencia de al menos dos subtipos de receptores  $\alpha_1$ -AR partiendo de la observación de la heterogeneidad farmacológica sobre la población de receptores  $\alpha_1$ . Posteriormente, se determinó la distinta potencia de agonistas y antagonistas de los receptores  $\alpha_1$  (García-Sáinz et al., 1985; Morrow & Creese, 1986; Han et al., 1987; Jonson et al., 1987; Minneman et al.,

1988: Minneman et al., 1988). A partir de entonces se clonaron y se caracterizaron los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ .

En 1990 se clonó un cDNA perteneciente a un nuevo subtipo de  $\alpha_1$ -AR, el cual fue llamado  $\alpha_{1C}$  (Schwinn et al., 1990); sin embargo, durante los estudios farmacológicos, de localización y de homología de secuencias se determinó que el subtipo  $\alpha_{1C}$  era realmente el  $\alpha_{1A}$  (Pérez et al., 1994).

En 1991 se identificó mediante clonación de cDNAs un nuevo subtipo de receptor, el  $\alpha_{1D}$ ; sin embargo, no fue fácil de obtener debido a la poca expresión del gen (Pérez et al., 1991). En los años siguientes otros grupos clonaron y localizaron el gen del  $\alpha_{1D}$ -AR humano en el cromosoma 20 (Forray et al., 1994; Weinberg et al., 1994; Schwinn et al., 1995). Adicionalmente, se reportó que el receptor se localiza en la aorta, la corteza cerebral y la próstata (Lomasney et al., 1991; Gram et al., 1996) y de manera menos abundante en el corazón, el pulmón, el bazo y los riñones (Price et al., 1994; Rokosh et al., 1994). También se determinó que su peso molecular es de  $\sim 70$ - $80$  kDa (Schwinn & Kwatra, 1998).

### **Vía de transducción de señal del receptor $\alpha_{1D}$ adrenérgico**

En 1973 se reportó por primera vez la activación de una fosfolipasa debida al estímulo de noradrenalina (Gullis & Rowe, 1973). Michell reportó dos años más tarde que agonistas que promovían un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular también estimulaban la actividad de la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ), ocasionando la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP $_2$ ). Se encontraron los productos de ésta hidrólisis: el diacilglicerol (DAG), y fosfoinosítidos solubles (Michell et al., 1975).

A partir de 1983 se demostró que el fosfolípido responsable del aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular era el inositol-1,4,5-trifosfato, IP $_3$  (Streb et al., 1983). A pesar de la controversia sobre el origen del  $Ca^{2+}$ , se demostró que provenía del retículo endoplásmico (Eysen & Reynolds, 1983; Clapper & Lee, 1983; Prentki et al., 1984). Se propuso también que la activación de este sistema de transducción era mediado por las proteínas Gq (Blackmore et al., 1983). A esta vía de transducción se le conoció como el sistema de recambio de fosfoinosítidos/ $Ca^{2+}$ , y se describió a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos como activadores de esta vía (Fain & García-Sáinz, 1980). Posteriormente se incluyó al subtipo  $\alpha_{1D}$ -AR como acoplado a Gq y activador del

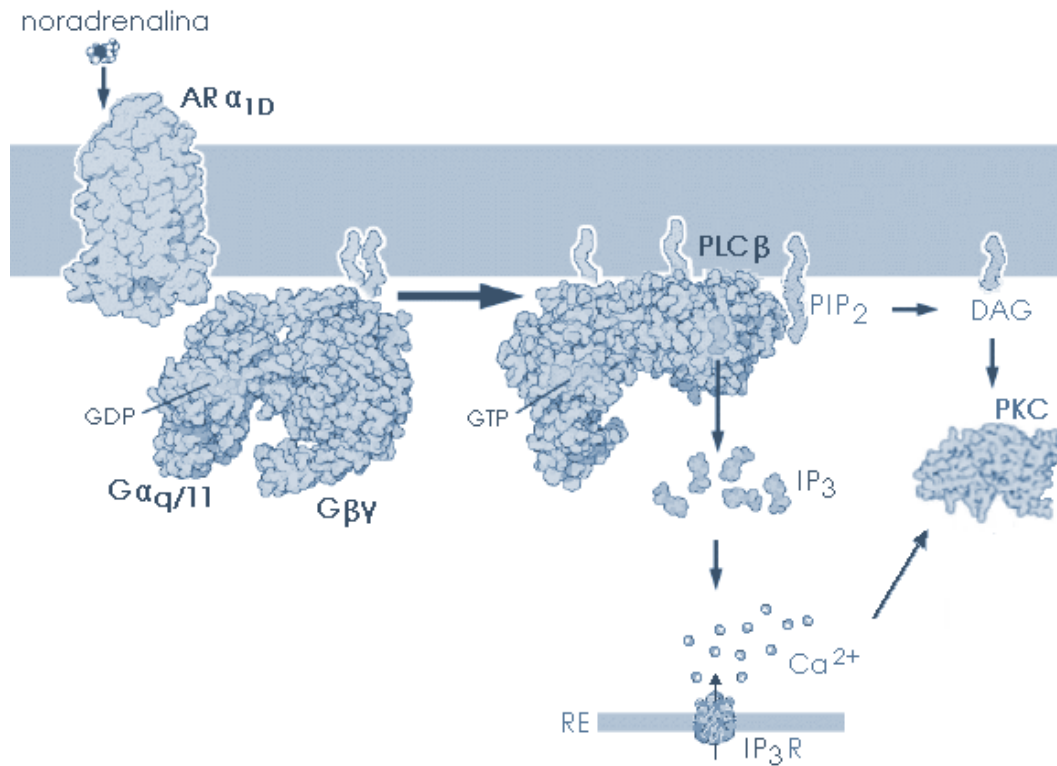


Fig. 3.2. Vía de transducción del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$ . La activación de las proteínas  $G_{q/11}$  promueve la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ) gracias a la acción de la fosfolipasa C  $\beta$  ( $PLC\beta$ ). La síntesis de  $IP_3$  promueve la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico. Estos segundos mensajeros promueven, entre otras acciones celulares, la activación de la Proteína Cinasa C (PKC).

sistema de fosfoinosítidos/ $Ca^{2+}$  (Pérez et al., 1993; Vázquez-Prado & García-Sáinz, 1996) (Fig. 3.2).

Como ocurría con otros GPCRs acoplados a  $G_q$ , se reportó que la PKC, por Protein Kinase C, (Benovic et al., 1985; Bouvier et al., 1986) también es capaz de fosforilar al  $\alpha_{1D}$ -AR y mediar su desensibilización (García-Sáinz et al., 2001, García-Sáinz et al., 2004).

## **IV. Receptores con actividad de tirosina cinasa**

### **Generalidades**

Otra de las superfamilias de receptores más importantes de mamíferos es la de receptores con actividad de tirosina cinasa, o RTKs, por Receptor Tyrosine Kinase. Esta superfamilia consta de ~60 miembros; la mayoría de éstos tienen como ligandos a factores de crecimiento, es decir, polipéptidos mitogénicos con funciones de proliferación, crecimiento, reparación, supervivencia, desarrollo, etc. Algunos de los RTKs más estudiados son los receptores para: EGF, PDGF, NGF, VEGF, FGF, IGF-I y para la insulina.

A principios de los 80s se describió la estructura general de estos receptores gracias a la clonación de sus cDNAs (Ebina et al., 1985; Ullrich et al., 1985; Seino et al., 1989; Matsui et al., 1989). Utilizando como modelo a los receptores de insulina, EGF, PDGF y de IGF-I, se comenzaron a determinar las características generales de los RTKs y se definieron 18 clases, de las cuales las más estudiadas son la I, II y III (Robinson et al., 2000).

El receptor de EGF es el modelo de la clase I de RTKs, los cuales están formados por una cadena polipeptídica y están localizados en la membrana citoplásmica gracias a un segmento hidrofóbico; poseen una región extracelular con sitios ricos en cisteínas y leucinas, que contiene el sitio de reconocimiento del ligando, y una región intracelular con actividad de tirosina cinasa que les permite transducir la señal (Ullrich et al., 1986; Ullrich et al., 1996; Hubbard & Hill, 2000; Garrett et al., 2002).

Los prototipos de la clase II son los receptores de insulina e IGF-I, formados por dos subunidades transmembranales  $\beta$  que contienen la región intracelular con actividad de tirosina cinasa, y por dos subunidades  $\alpha$  que contienen el sitio de reconocimiento del ligando, unidas por puentes disulfuro a las subunidades  $\beta$  (Pilch & Czech, 1979; Massague et al., 1980; Massague & Czech, 1982; Van Obberghen et al., 1983; Cohen et al., 1991; Joost et al., 1995).

El receptor de PDGF es el prototipo de la clase III de RTKs, los cuales están formados por una cadena polipeptídica de forma análoga a los RTKs de la clase I; en su segmento extracelular contienen dominios semejantes a inmunoglobulinas, los cuales

les permiten la interacción con el ligando (Glenn et al., 1982; Heldin et al., 1983; Yarden et al., 1986; Bajaj et al., 1987).

Paralelamente al descubrimiento de la estructura de estos receptores, se caracterizó que la unión del ligando promovía su fosforilación (Cohen et al., 1979; Ushiro & Cohen, 1980; Petruzzelli et al., 1982), y en 1983 se descubrió que eran los mismos receptores los que tenían la actividad de tirosina cinasa en los segmentos intracelulares, y que se autofosforilaban (Roth & Cassell, 1983; Yarden & Schlessinger, 1987; Lammers et al., 1990). Adicionalmente, se descubrió que la unión del ligando promovía la dimerización de los receptores, y que ésta era necesaria para la autofosforilación y para la transducción de la señal (Yarden & Schlessinger, 1987).

Estos descubrimientos permitieron proponer un modelo de activación de los RTKs: el monómero del receptor reconoce al ligando; esta unión permite la dimerización, lo cual promueve un cambio conformacional y la proximidad de las regiones intracelulares, ocasionando la fosforilación de un monómero al otro. Esta fosforilación se lleva a cabo en tirosinas y activa al receptor, lo que le permite ser reconocido por moléculas señalizadoras y transducir su señal (Heldin & Ostan, 1996) (Fig. 4.1).

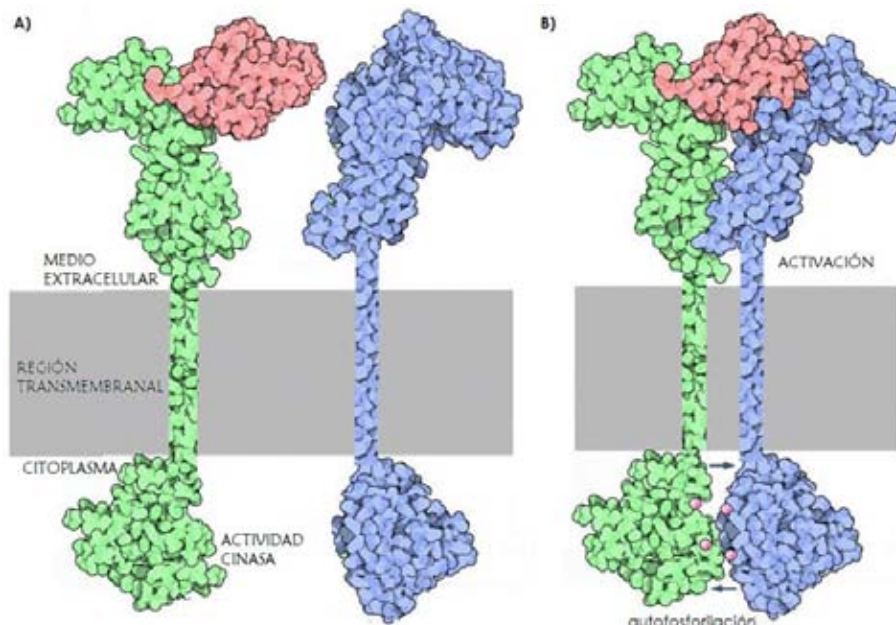


Fig. 4.1. Estructura de los receptores con actividad de tirosina cinasa (clase I y II) y modelo de activación. Se muestran en verde y azul las subunidades del receptor y en rosa el factor de crecimiento. A) Unión del ligando al monómero del receptor, reconocimiento del otro monómero. B) Formación del dímero, activación del receptor y autofosforilación en la región citoplásmica.



## **Vía de transducción de los RTKs**

A principios de los 80s se comenzaron a descubrir las proteínas pertenecientes a la vía de transducción de algunos RTKs como el EGFr, el IGF-Ir y el receptor de insulina. Se describieron cinasas y proteínas de anclaje que se activaban en respuesta al estímulo de estos receptores y que tenían sitios de reconocimiento específicos proteína-proteína, como los SH2, SH3 y PDZ, y sitios de reconocimiento proteína-lípidos de membrana, como los PH (Koch et al., 1991; Pawson & Schlessinger, 1993; Musacchio et al., 1993; Gibson et al., 1994; Kramarcy et al., 1994; Sealock et al., 1994; Adams et al., 1995). Estos dominios de interacción les permiten a las proteínas pertenecientes a una vía de transducción específica reconocerse y activarse para mediar su señal (Pawson et al., 1995).

Una parte fundamental de la transducción de la señal mediada por los RTKs es la activación de cinasas que al fosforilar sustratos específicos los regulan (Letierrier et al., 1981). Las cinasas activadas en las dos vías de transducción de RTKs más importantes se mencionan a continuación: las MAPK y PI3K/Akt; sin embargo, éstas no son las únicas vías de señalización mediadas por RTKs.

Una de las primeras familias de cinasas activadas por RTKs descritas fueron las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos, o MAPK. Estas cinasas de serina/treonina también se relacionaron directamente con efectos de crecimiento y proliferación celular (Akiyama et al., 1986; Coughland & Hind, 1987). Se han reportado tres familias pertenecientes a las MAPKs: ERK 1/2, JNK y p38 (Ray & Sturghill, 1987; Miyasaka et al., 1990; Kato et al., 1997; Weston et al., 2002).

Paralelamente, se describió la generación de dos segundos mensajeros gracias a la activación del receptor de EGF: el fosfatidil inositol 1, 4, 5 trifosfato, PIP<sub>3</sub>, debido a la activación de la fosfoinosítido 3-cinasa, PI3K; e inosítoles trifosfato, IP<sub>3</sub>, debido a la activación de la fosfolipasa C  $\gamma$ , PLC  $\gamma$  (Whitman et al., 1988; Westermarck et al., 1989; Meisenhelder et al., 1989; Ruderman et al., 1990; Margolis et al., 1990). Posteriormente se relacionó al producto del oncogene c-Akt, la cinasa Akt, o PKB, con la vía de señalización de los RTKs gracias a la activación por PIP<sub>3</sub> (Bellacosa et al., 1991; Franke et al., 1995; Datta et al., 1996).

Se han descrito una gran cantidad de proteínas activadas en la vía de transducción de los RTKs y se ha reportado la asociación de éstas a distintos receptores y en diferentes

tipos celulares. Éstas son en su mayoría cinasas, fosfatasas, proteínas de anclaje, factores de transcripción, proteínas con funciones mitogénicas, de remodelaje de citoesqueleto, motilidad, supervivencia, entre otras funciones celulares fundamentales. Las más estudiadas hasta el momento son: SHC, Ras, Sos-1, Raf-1, Ab1, Zap70, Syk, Tyk, PLC $\gamma$ , Rho, Ras, PKB/Akt, Bcl-2, IRS-1/2, MEK, PDK, mTOR, NF $\kappa$ B, Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes y Yrk entre otras decenas de proteínas (Levinson et al, 1979; Oppermann et al, 1979; Shih & Weinberg, 1982; Shimizu et al., 1986; Lees-Miller & Anderson, 1989; Bos, 1989; Wilks et al., 1989; Simon et al., 1991; Meldrum et al., 1991; Stockoe et al., 1992; Kyriakis et al., 1992; Chan et al., 1992; Rhee et al., 1992;; Lioubin et al., 1994; Thomas & Samelson, 1992; Shenoy-Scaria et al, 1992; Mumby et al., 1993; Ruff-Jamison et al., 1993; Hibbs & Duna, 1995; Li et al., 1997; Turner et al., 2000; Hubbard & Till, 2000).

Cabe mencionar que la activación y/o inactivación de estas proteínas debido a los RTKs depende del contexto y del tipo celular. Debido a esto, es extremadamente difícil hacer generalizaciones sobre las vías de señalización de los RTKs, y debe estudiarse la activación de cada receptor específico en circunstancias celulares particulares.

## **El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y su receptor**

A principios de los 60s, Cohen descubrió que una proteína obtenida de las glándulas submaxilares del ratón inyectadas en ratones recién nacidos promovía cambios dramáticos en su desarrollo (Cohen, S. 1960; Cohen, S. 1961). Se aisló y caracterizó a esta proteína y le llamó EGF por Epidermal Growth Factor (Cohen, 1961; Cohen, 1962; Cohen, 1963; Cohen, 1964; Cohen, 1965).

El EGF, o factor de crecimiento epidérmico, es un polipéptido de ~6 kDa con efectos mitogénicos sobre múltiples tejidos y órganos. Ha sido implicado en una gran cantidad de acciones celulares que incluyen la proliferación y supervivencia, la reparación de tejidos, la morfogénesis, etc. El EGF media todas estas acciones fisiológicas gracias a la unión específica con su receptor, el EGFr.

Cabe mencionar que existen moléculas “EGF-like”, es decir, péptidos que son capaces de unirse con afinidad al EGFr y producir las mismas respuestas fisiológicas. Algunas de estas moléculas se encuentran ancladas en la membrana plasmática o la matriz extracelular, lo cual permite que bajo ciertas condiciones se liberen y de forma soluble

puedan estimular a receptores de la misma célula o de células adyacentes (Daub et al., 1996). Dentro de esta familia se encuentran: el TGF $\alpha$ , HB-EGF, anfiregulina, betacelulina, epiregulina y neuregulina (Carpenter & Wahl, 1990; Higashiyama et al., 1991; Higashiyama et al., 1992; Pathak et al., 1995).

Los primeros reportes sobre el receptor para EGF, o EGFr, surgieron a principios de los 70s. Se demostró que eran receptores membranales, que al ser activados estimulaban la síntesis de DNA, que su peso molecular era de  $\sim$ 170 kDa (Hollenberg & Cuatrecasas, 1973; Das et al., 1977), que son monoméricos y que se dimerizan gracias a la unión del ligando (Roth & Cassell, 1983; Yarden & Schlessinger, 1987; Lammers et al., 1990). Recientemente se reportó la estructura tridimensional del receptor por estudios de cristalografía de rayos X (Lu et al., 2001).

## **El Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF) y su receptor**

En 1974, dos grupos distintos descubrieron un factor de crecimiento derivado de plaquetas que promovía el crecimiento tanto de fibroblastos como de músculo (Ross, et al., 1974; Kohler & Lipton, 1974). Para 1979 ya se había purificado, caracterizado bioquímicamente, y nombrado como PDGF, por Platelet-Derived Growth Factor (Antoniades et al., 1975; Antoniades et al., 1977; Antoniades et al., 1979).

El PDGF, o factor de crecimiento derivado de plaquetas, es un polipéptido mitogénico, que cuenta con cuatro isoformas: A, B, C y D, de las cuales las isoformas A y B forman homo o hetero-dímeros, unidos por puentes disulfuro, para activar a su receptor, el PDGFr (Matsui et al., 1989). Cada isoforma pesa entre  $\sim$ 12 y  $\sim$ 13.5 kDa.

El receptor para PDGF, o PDGFr, fue caracterizado a principios de los 80s como un receptor perteneciente a la familia de los RTKs con un dominio transmembranal con actividad de tirosina cinasa y con una región extracelular rica en dominios de inmunoglobulina, lo cual le permite el reconocimiento y la interacción con su ligando (Heldin et al., 1981; Boewn-Pope et al., 1982; Lewis et al., 1982; Heldin et al., 1982; Glenn et al., 1982; Heldin et al., 1983; Yarden et al., 1986).

## **La insulina y su receptor**

En 1921, Fred Banting y Charles Best obtuvieron un extracto pancreático con propiedades antidiabéticas en perros. Junto con sus colaboradores MacLeod y Collip, aislaron y probaron la hormona en humanos diabéticos por primera vez en 1922. Se le llamó “insulina” (*insulin*) por la palabra en latín *insula* –isla, debido a su producción en los islotes de Langerhans. En 1923 Banting y McLeod fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por este descubrimiento.

La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos producido en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. Se libera al torrente sanguíneo en respuesta a altas concentraciones de glucosa en sangre. Sus efectos metabólicos más importantes son la internalización de glucosa en tejido adiposo y músculo y la síntesis de ácidos grasos y glicógeno en el hígado y tejido graso, lo que disminuye la concentración de glucosa en sangre hasta alcanzar los niveles fisiológicos normales. Además de estas acciones, tiene efectos sobre casi todos los órganos y tejidos, algunos de éstos son: la captación celular de glucosa, potasio y aminoácidos, incremento en la síntesis de proteínas, disminución de la lipólisis, la glucogenólisis y la gluconeogénesis, entre otros.

El receptor de insulina fue descrito a principios de los 60s y se reportó que su activación promovía la internalización de glucosa y ácidos grasos (Cadenas et al., 1961; Fong et al., 1962). Se describió que es un receptor transmembranal (Cuatrecasas, 1971; Flier et al., 1977), y que está formado de cuatro subunidades: dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ , unidas por puentes disulfuro, y su peso molecular es de ~300 kDa (Cuatrecasas, 1972; Jacobs et al., 1979; Pilch & Czech, 1979; Massague et al., 1980; Massague & Czech, 1982; Massague et al., 1982). También se describió su actividad de cinasa de tirosina (Kasuga et al., 1982; Kasuga et al., 1982).

Una particularidad de la vía de señalización del receptor de insulina es la existencia de una molécula adaptadora que al fosforilarse media la interacción del receptor con sus cinasas efectoras, como la PI3K. Esta proteína, conocida como IRS, por Insulin Receptor Substrate, fue descrita por el grupo de Kahn en 1987 (White et al., 1987; Giorgetti et al., 1993).

# **Antecedentes**

---

## V. Comunicación cruzada entre RTKs y GPCRs

---

### Generalidades

La comunicación cruzada o cross-talk, en inglés, entre receptores acoplados a proteínas G y receptores con actividad de tirosina cinasa ha sido caracterizada desde finales de los 80s por diversos grupos, siendo el grupo del Dr. García-Sáinz pionero en esta área. Se han propuesto varios tipos de cross-talk entre estas superfamilias de receptores dependiendo del efecto de la activación de un receptor sobre el otro, ya sea inhibitorio, activador o potenciador.

Se ha descrito de manera clara que la estimulación de algunos GPCRs promueve la activación de RTKs. A este fenómeno se le conoce como transactivación, y se ha reportado, entre otros, para los siguientes pares de receptores: ET<sub>A</sub>/EGFr, LPA<sub>1</sub>/EGFr, PAR1/EGFr, AT<sub>1</sub>/PDGFr, S1P/PDGFr, D<sub>2</sub>/PDGFr (Daub et al., 1996; Venugopalan et al., 2003; Tanimoto et al., 2004; Li et al., 2005; Casas-González & García-Sáinz, 2006; El-Shewy et al., 2006).

También se ha descrito el proceso de transactivación en el que algunos RTKs al activarse promueven la estimulación de GPCRs. Algunos ejemplos son los siguientes: IGF-1/PAC1, IGF-I/S1P, PDGF/S1P, NGF/LPA<sub>1</sub>, (Alderton et al., 2001; Moughal et al., 2004; El-Shewy et al., 2006; Delcourt et al., 2007).

Además de la transactivación, se han descrito procesos de desensibilización heteróloga de GPCRs, en los cuales éstos pierden su capacidad de responder al agonista debido a la activación de algún RTK. Algunos ejemplos de estas interacciones son: EGFr/ $\alpha_{1B}$ AR, PDGFr/ $\alpha_{1B}$ AR, IGF-Ir/ $\alpha_{1B}$ AR, insulina/ $\beta_2$ AR, insulina/LPA<sub>1</sub>, IGF-I/ $\beta_1$ AR (Medina et al., 2000; Casas-González et al., 2003; Dallé et al., 2002; Molina-Muñoz et al., 2006; Gavi et al., 2007; García-Sáinz et al., En prensa).

Resulta claro que existe regulación funcional entre GPCRs y RTKs, y que ésta tiene implicaciones fisiológicas muy importantes; el estudio de éstas es un campo incipiente, y a pesar de que existen ya algunos reportes sobre las consecuencias celulares de la transactivación y/o desensibilización de ciertos receptores en circunstancias normales y patológicas, es difícil hacer generalizaciones, por lo que debe estudiarse el papel de un receptor particular en la regulación de algún otro, de manera muy puntual.

## **Cross-talk entre $\alpha_1$ -AR y RTKs**

El grupo de investigación encabezado por el Dr. Adolfo García-Sáinz, ha sido líder en el estudio de la regulación de los receptores  $\alpha_1$ AR desde principios de los años 80s. Una década después, se reportó en el laboratorio por primera vez, que la activación de algunos GPCRs como el receptor de endotelina, el de bradicinina y el de LPA eran capaces de fosforilar y desensibilizar al  $\alpha_{1B}$  AR mediante la participación de la PKC (Vázquez-Prado et al., 1997; Medina et al., 1998; Casas-González et al., 2000).

En el 2000 se reportó el cross-talk entre un receptor  $\alpha_1$ AR y RTKs. Se describió que los receptores para EGF y PDGF eran capaces de fosforilar al receptor  $\alpha_{1B}$ AR (Medina et al., 2000). Posterior a este reporte se ha descrito que los receptores para insulina e IGF-I también son capaces de fosforilar y desensibilizar al  $\alpha_{1B}$ AR (García-Sáinz et al., 2004; Molina-Muñoz et al., 2006). En todos estos manuscritos se determinó que la fosforilación del  $\alpha_{1B}$ AR debida a EGF, PDGF, IGF-I e insulina es dosis-dependiente y que está mediada por las cinasas PKC y PI3K.

En el 2001 se realizó el primer trabajo con el receptor  $\alpha_{1D}$ AR y se determinó que se fosforilaba y desensibilizaba de manera homóloga y heteróloga, al activar GPCRs como los de LPA, bradicinina y endotelina (García-Sáinz et al., 2001). En el 2007 se realizó un trabajo sobre la desensibilización heteróloga del  $\alpha_{1D}$ AR mediada por el receptor para IGF-I (En prensa).

# **Justificación y Objetivos**

---



## **Justificación del proyecto**

---

A pesar de que existen reportes sobre cross-talk entre el  $\alpha_{1B}AR$  y RTKs como el EGF, PDGF, IGF-I e insulina, no existe ninguno sobre este fenómeno en el receptor  $\alpha_{1D}AR$ . Debido que estos subtipos presentan similitudes importantes, es importante caracterizar si algunos RTKs son capaces de desensibilizar y/o fosforilar al  $\alpha_{1D}AR$ , y de ser así, determinar los mecanismos moleculares que intervienen en este proceso.

Es importante señalar que a pesar de la similitud entre los receptores  $\alpha_{1B}AR$  y  $\alpha_{1D}AR$ , existen diferencias significativas entre ellos. Una de las más importantes es que los receptores  $\alpha_{1D}AR$  no comparten los sitios de fosforilación ya definidos para el receptor  $\alpha_{1B}AR$  (Diviani et al., 1997; García-Sáinz et al., 2001). Estas diferencias podrían representar divergencias en los mecanismos de regulación heteróloga de estos receptores.

El estudio de esta regulación funcional del  $\alpha_{1D}AR$  por los receptores para EGF, PDGF e insulina tiene implicaciones fisiológicas relevantes, debido a que el receptor  $\alpha_{1D}AR$  es expresado en células donde también se encuentran los receptores para EGF, PDGF e insulina. Se espera que el caracterizar un posible proceso de regulación entre estos receptores a nivel básico tenga relevancia en futuras investigaciones destinadas a comprender procesos celulares o patológicos en los que estos receptores estén involucrados.

## **Objetivo general**

---

Determinar si la activación de los receptores para el Epidermal Growth Factor (EGF), el Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) y para insulina son capaces de desensibilizar y fosforilar al receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}AR$  humano en células Rat-1.

## **Objetivos experimentales**

---

Determinar la desensibilización funcional del  $\alpha_{1D}AR$  mediante la cuantificación de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular en respuesta a noradrenalina (NA) en condiciones basales y después del estímulo con EGF, PDGF e insulina.

Obtener los parámetros farmacodinámicos de la desensibilización mediada por el EGF, PDGF e insulina sobre el  $\alpha_{1D}AR$  para establecer el tipo de desensibilización que sufre el receptor como consecuencia del tratamiento con estos factores. Para ello se realizarán curvas dosis-respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  de la respuesta a NA en condiciones basales y después del estímulo con EGF, PDGF e insulina.

Examinar la posible participación de las cinasas PKC y PI3-K en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por EGF, PDGF e insulina, mediante el uso de inhibidores farmacológicos selectivos de ambas cinasas en un ensayo de cuantificación de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Establecer la potencial participación de  $G\alpha_i$  en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por EGF, PDGF, insulina e IGF-I mediante el uso de la toxina pertussis en un ensayo de cuantificación de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Determinar si la desensibilización funcional del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por EGF, PDGF e insulina es debida a la fosforilación del receptor, mediante un ensayo de marcaje metabólico con  $[^{32}P]$  e inmunoprecipitación.

Obtener los parámetros farmacodinámicos de la fosforilación mediada por el EGF, PDGF e insulina sobre el  $\alpha_{1D}AR$ . Para ello se realizarán curvas dosis-respuesta determinando la incorporación de  $[^{32}P]$  al  $\alpha_{1D}AR$  en condiciones basales y después del estímulo con EGF, PDGF e insulina.

Establecer la participación de las cinasas PKC y PI3-K en la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por EGF, PDGF e insulina, mediante el uso de inhibidores farmacológicos selectivos de ambas cinasas en un ensayo de incorporación de  $[^{32}P]$ .

Determinar la posible participación de  $G\alpha_i$  en la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por EGF, PDGF, insulina e IGF-I mediante el uso de la toxina pertussis en un ensayo de incorporación de  $^{32}P$ .

# **Procedimientos experimentales**

---

## **Materiales**

---

Los siguientes reactivos: (2)-Norepinefrina, estaurosporina, bisindolilmaleimida I, ácido lisofosfatídico, LY294002, wortmanina, insulina bovina y los inhibidores de proteasas: leupeptina, inhibidor de tripsina y bacitracina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. El medio de cultivo DMEM, suero fetal bovino, tripsina, antibióticos y otros reactivos utilizados para cultivo celular fueron comprados de Life Technologies, Inc. El [<sup>32</sup>P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) fue obtenido de NEN Life Science Products. Las perlas de proteína A-agarosa fueron de Upstate Biotechnology. El Fura2/AM fue comprado de Molecular Probes. La toxina pertussis fue purificada en nuestro laboratorio de vacunas concentradas. El EGF, PDGF-BB e IGF-I fueron obtenidos de Preprotech. Los anti-sueros utilizados fueron obtenidos de conejos inmunizados en el laboratorio.

## **Metodologías**

---

### **Cultivo celular**

Se realizó el cultivo de fibroblastos Rat-1 (*Rattus norvegicus*) que expresan establemente el receptor  $\alpha_{1D}$ -AR como se reportó previamente (García-Sáinz & Torres-Padilla, 1999; García-Sáinz et al., 2001; García-Sáinz et al., 2004). Las células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad en medio de alta glucosa y glutamina, DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino, 300mg/ml del antibiótico de selección análogo a la neomicina, G-418, 100mg/ml de estreptomycin, y 0.25mg/ml de amfotericina B, a 37°C bajo condiciones de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>. Para los experimentos en condiciones de ayuno se utilizó DMEM sin suero fetal bovino y sin antibióticos. Para los experimentos de condiciones de ayunos sin fosfatos se utilizó DMEM sin suero fetal bovino, sin antibióticos y sin fosfatos.

### **Determinación de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

Se realizó la determinación de Ca<sup>2+</sup> intracelular conforme reportes previos del laboratorio (Vazquez-Prado & García-Sáinz, 1996; García-Sáinz et al., 2001; García-Sáinz et al., 2004). Se sembraron las células a confluencia y se ayunaron sin suero toda la noche. Al día siguiente se cargaron con 5mM de Fura2/AM en medio Krebs-

Ringer-Hepes-Ca<sup>2+</sup> por 1h. a 37°C. Las células se despegaron de la caja con tripsina y se resuspendieron en 6ml de medio. Se lavaron 3 veces centrifugando a 3000 RPMs por 3 min, se resuspendieron en 12ml de medio y se tomaron 2ml para cada muestra. Se leyeron las muestras en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman Series 2 con los monocromadores de excitación a 340nm y los de emisión a 510nm. Los cálculos de la concentración de Ca<sup>2+</sup> se realizaron con el software AB2 utilizando los parámetros de la fórmula descrita por Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985).

### **Fosforilación e inmunoprecipitación del $\alpha_{1D}$ -AR**

Los protocolos se realizaron de acuerdo a lo reportado en anteriormente en el laboratorio (Vazquez-Prado et al., 1997; García-Sáinz et al., 2001; García-Sáinz et al., 2004). Las células se sembraron en cajas de 6 pozos a confluencia y se ayunaron toda la noche en medio sin suero y sin fosfatos. Se cargaron con 0.05mCi/ml de [PO<sub>4</sub>]<sup>32</sup> por 3hrs, a 37°C. Se estimularon por los tiempos establecidos a 37°C y se eliminó el medio. Se agregó 0.5ml de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (PMSF, bacitracina, inhibidor de tripsina, leupeptina) y fosfatasas (fosfo-tirosina, fosfo-treonina, fosfo-serina,  $\beta$ -glicerofosfato, NaF, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Na<sub>4</sub>V<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) por 1hr a 4°C. Se obtuvieron lisados y se centrifugaron a 15000 RPM por 15 min. Se obtuvo el sobrenadante y se inmunoprecipitó al receptor utilizando 5 $\mu$ l de antisuero de conejos y 20 $\mu$ l de perlas de proteína A-agarosa/PBS durante toda la noche a 4°C en movimiento. Se centrifugaron los complejos inmunes y se lavaron 3 veces con buffer de lavados con NaF, tritón 10% y SDS 1% y se desnaturalizaron las muestras con 25 $\mu$ l de SDS 10%/Urea 8M (1:1 v/v) y con 25 $\mu$ l de buffer Laemmli e hirviendo por 10 min. Se cargaron 25 $\mu$ l de cada muestra en geles de poliacrilamida/bisacrilamida (30:0.8 w/w) al 10% y se corrieron a 100V. Se secaron al vacío y fueron expuestos en placas Kodak para leerse en el Typhoon PhosphorImager. El análisis densitométrico se llevó a cabo con el software ImageQuant.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron y graficaron con el Software Graph Pad Prism 4.0. Se presentan los datos como promedios de  $\pm$  SEM. A los datos presentados en gráficas de barras se les aplicó un análisis de varianza ANOVA de un sentido, y un post de Bonferroni para comparación múltiple. A los datos presentados como curvas dosis-respuesta se les aplicó un análisis paramétrico de curva dosis-respuesta sigmoidal. La n de todos los experimentos presentados es de por lo menos 3 repeticiones.

# **Resultados**

---

## Determinación de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

Se realizó un ensayo funcional del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR determinando el incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Se estimularon las células con  $10\mu\text{M}$  de noradrenalina (NA) y se observó un incremento casi inmediato a  $\sim 1500\text{ nM}$  en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig. 1A). Para determinar el efecto del tratamiento con los factores: EGF, PDGF e insulina sobre la activación del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR, se incubaron las células durante 15 minutos con cada uno de los factores y después se estimuló con NA. En todos los casos se observó una disminución del incremento en la respuesta obtenida con NA sin pretratamiento con ningún factor (Fig. 1B, 1C, 1D).

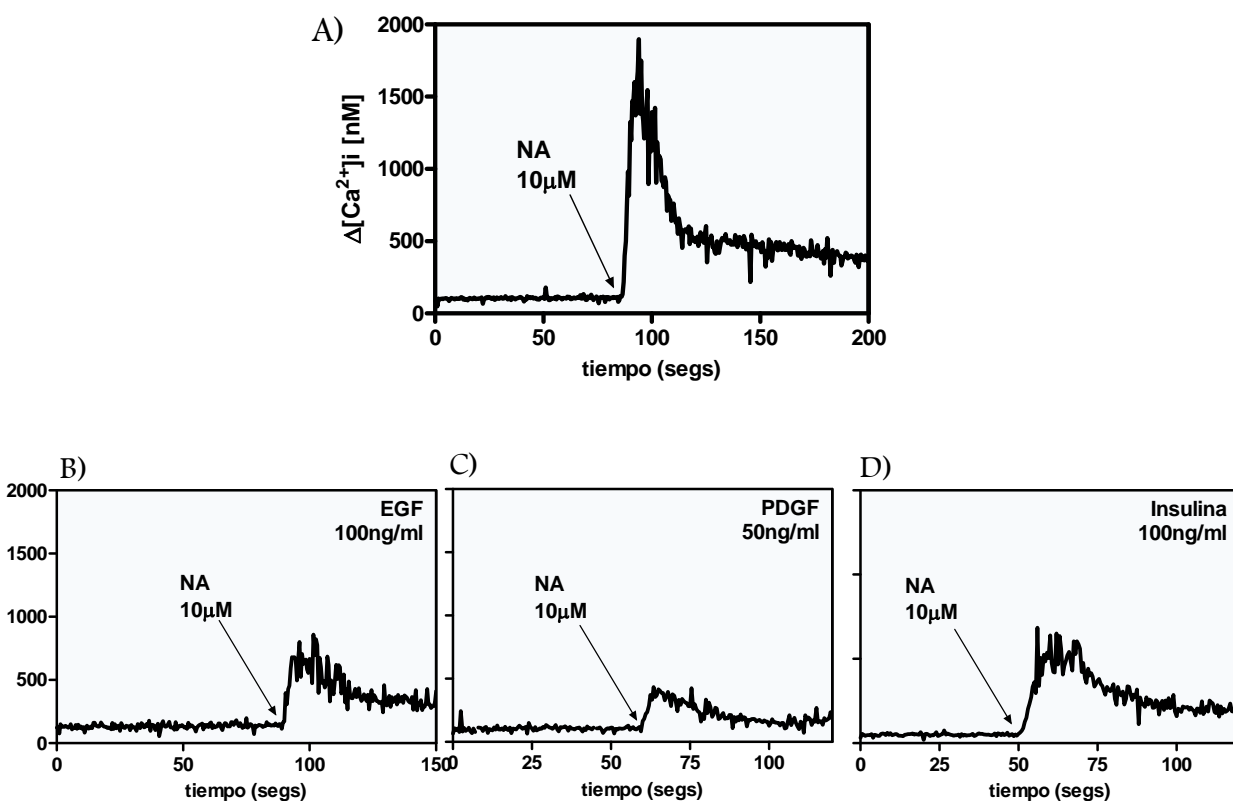


Fig. 1. Determinación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: Células Rat-1 cargadas con Fura2/AM y resuspendidas en medio Krebs-Ringer-  $\text{Ca}^{2+}$  fueron estimuladas con: A): Noradrenalina (NA)  $10\mu\text{M}$ , B): EGF  $100\text{ng/ml}$  15 min. + NA  $10\mu\text{M}$ , C): PDGF  $50\text{ng/ml}$  15 min. + NA  $10\mu\text{M}$ , e D) Insulina  $100\text{ng/ml}$  15 min. + NA  $10\mu\text{M}$ .

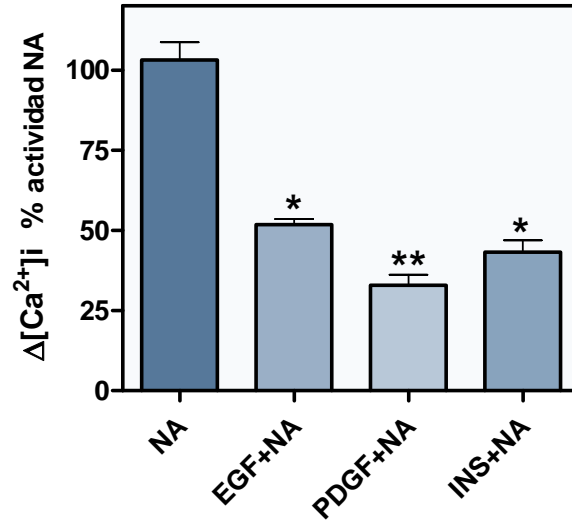


Fig. 2. Gráfica comparativa de la determinación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: Se muestran los porcentajes de respuesta a NA  $10\mu\text{M}$  en células sin estimulación previa (NA) y estimuladas con EGF  $100\text{ng/ml}$   $15\text{ min.}$ , PDGF  $50\text{ng/ml}$   $15\text{ min.}$  e insulina  $100\text{ng/ml}$   $15\text{ min.}$  \*  $P < 0.001$  vs NA, \*\*  $P < 0.001$  vs NA y  $P < 0.05$  vs EGF +NA e INS+NA

Se determinó el porcentaje de respuesta obtenida con NA en los tratamientos con cada factor con respecto al basal (NA) (Fig. 2). Los tratamientos con EGF, PDGF e insulina disminuyeron significativamente la respuesta funcional del  $\alpha_{1D}\text{-AR}$ , de los cuales el PDGF fue el factor que desensibilizó más al receptor, siendo significativo con respecto al EGF y a la insulina.

Posteriormente, realizaron curvas dosis-respuesta con cada factor: EGF, PDGF e insulina. Para tal efecto se determinó la respuesta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a diferentes concentraciones de NA, y posteriormente, se determinó la respuesta a las mismas concentraciones de NA después de  $15\text{ min.}$  de tratamiento con los diferentes factores: EGF (Fig. 3A), PDGF (Fig. 3B) o insulina (Fig. 3C).



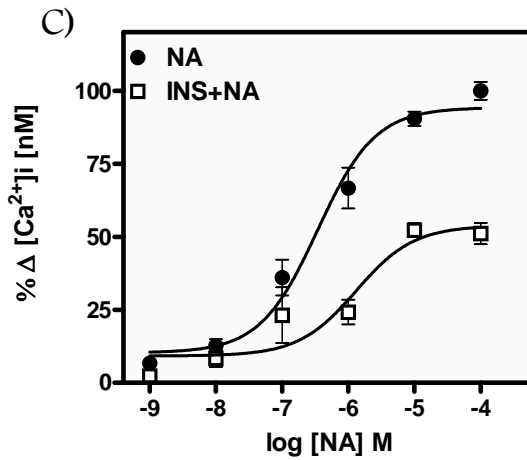
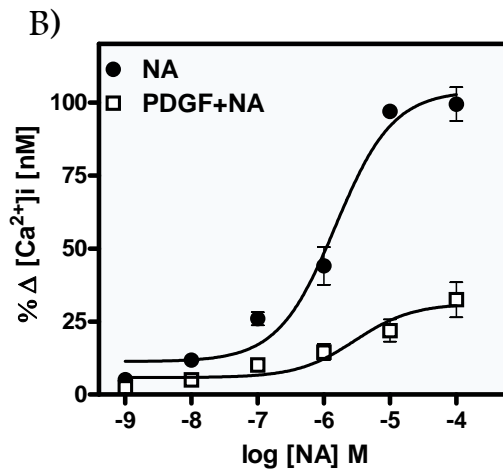
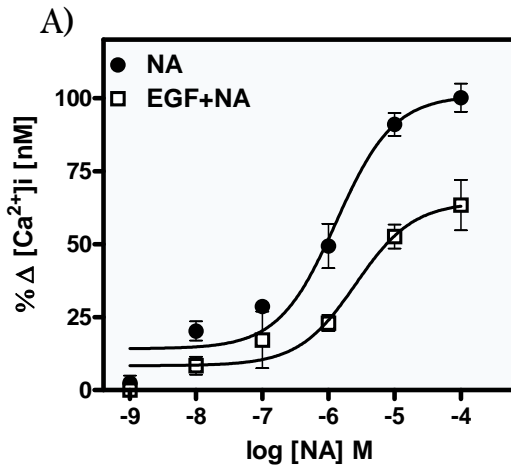


Fig. 3. Curva dosis-respuesta en determinación de Ca<sup>2+</sup>: Células Rat-1 cargadas con Fura 2/AM fueron estimuladas con: A) Diferentes [NA] sin (●) y con (□) EGF 100ng/ml 15 min, Diferentes [NA] sin (●) y con (□) PDGF 50ng/ml 15 min, y C) Diferentes [NA] sin (●) y con (□) Insulina 100ng/ml 15 min.

Posteriormente se calcularon los parámetros farmacodinámicos de cada curva, y se realizó el análisis estadístico. Se obtuvieron los siguientes datos:

	Potencia (EC50)	Act. Máxima (%)
NA	~2.0 $\mu$ M	100%
EGF+NA	~2.5 $\mu$ M *	56.7% **
PDGF+NA	~1.3 $\mu$ M *	27.1% **
INS+NA	~2.9 $\mu$ M *	51.3% **

\* P < 0.05 vs NA, \*\* P > 0.05 vs NA

Se observa en la tabla que los valores de EC50 en los tres tratamientos no son diferentes desde el punto de vista estadístico con respecto al grupo control (NA); sin embargo, en los valores de actividad máxima, los tres tratamientos muestran diferencias significativas al grupo control. Estos datos sugieren que el tipo de desensibilización que sufre el  $\alpha_{1D}$ -AR después del tratamiento con EGF, PDGF e insulina se debe a que estos factores que modifican su capacidad para alcanzar la respuesta máxima del agonista.

Después de determinar la disminución de la respuesta del  $\alpha_{1D}$ -AR por los distintos factores probados, la siguiente estrategia fue establecer si el mecanismo de transducción de los receptores para EGF, PDGF e insulina desensibilizaba al receptor  $\alpha_{1D}$ -AR. Para esto, se determinó si algunas cinasas activadas por estos receptores mediaban la disminución de la respuesta del  $\alpha_{1D}$ -AR. Se probó entonces la posible participación de dos cinasas: PI3K y PKC.

Para tal efecto se probó la respuesta funcional del  $\alpha_{1D}$ -AR en un ensayo de determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  después del tratamiento con EGF, PDGF e insulina en presencia de inhibidores farmacológicos: estaurosporina (STAU) y bisindolilmaleimida I (BIM), inhibidores de PKC; y wortmanina (WORT) y LY294002 (LY), inhibidores de PI3K (Fig. 4A, 4B y 4C). Se expresaron los resultados como porcentaje de la respuesta máxima a la NA.

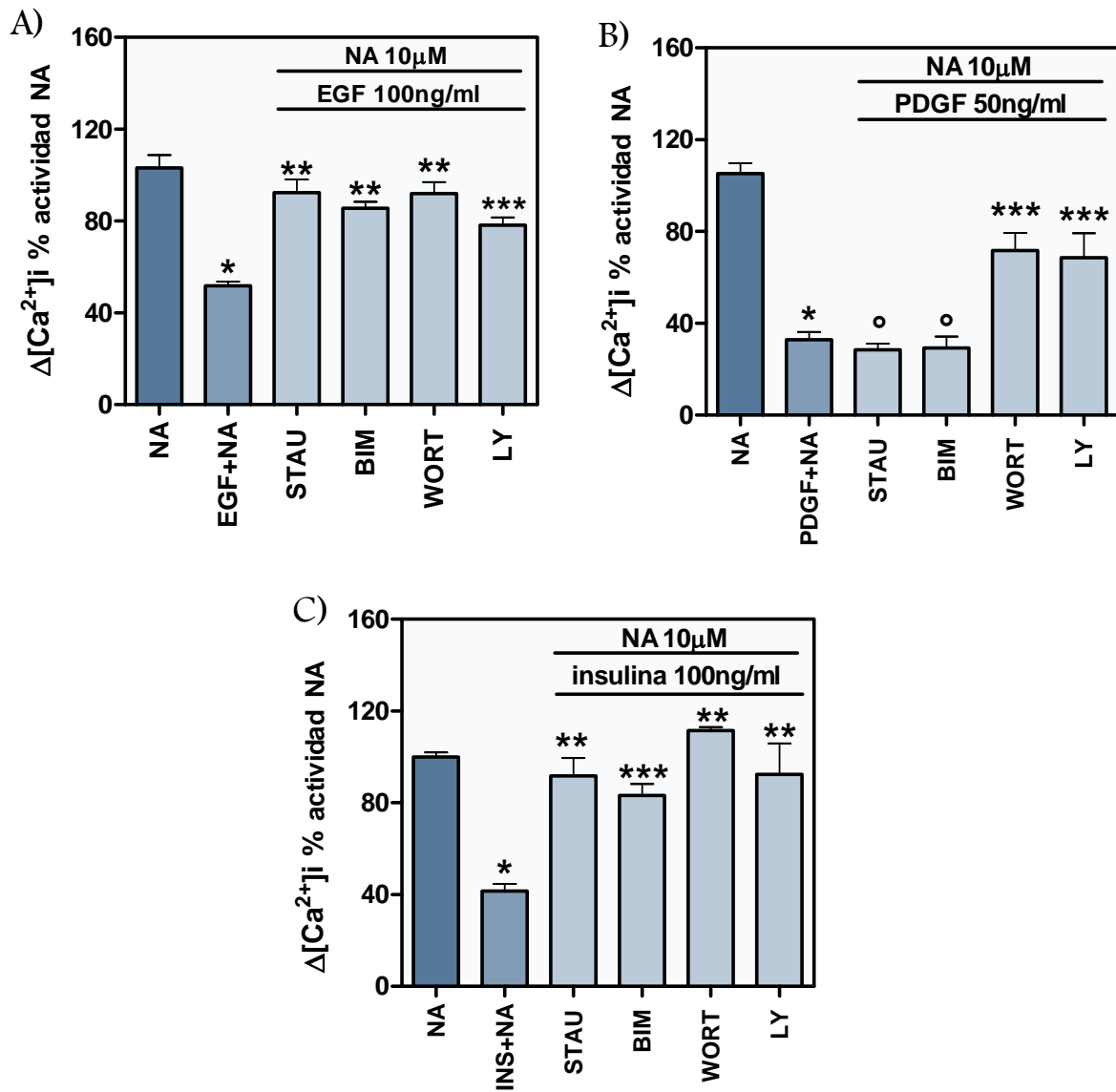


Fig. 4. Determinación de Ca<sup>2+</sup> con inhibidores de la PKC y la PI3K: Células Rat-1 cargadas con Fura 2/AM y resuspendidas en medio Krebs-Ringer- Ca<sup>2+</sup> fueron estimuladas con: wortmanina 100nM (WORT), LY 294002 1mM (LY), staurosporina 100nM (STAU) o BIM 1mM (BIM), 15 min. y en todos los casos con A) EGF 100ng/ml 15 min., B) PDGF 50ng/ml 15 min. y C) insulina 100ng/ml 15 min y NA 10μM. \* P < 0.001 vs NA, \*\* P > 0.05 vs NA, \*\*\* P < 0.001 vs EGF+NA, PDGF+NA e INS+NA; <sup>o</sup> P > 0.05 vs PDGF+NA.

Los resultados obtenidos demuestran lo siguiente: en el caso del tratamiento con EGF e insulina, la inhibición de PI3K y de PKC reestablece la respuesta funcional del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR de forma significativa, lo cual implica la participación de ambas cinasas en la desensibilización mediada por estos factores. Debido a que la respuesta obtenida con la inhibición de cada cinasa no muestra diferencias significativas con respecto al grupo control (NA), se sugiere que estas cinasas actúan de forma secuencial y no simultáneamente, ya que al inhibir cualquiera de las dos se inhibe la desensibilización de manera total.

Sin embargo, en el caso del tratamiento con PDGF la inhibición de PI3K recuperó sólo parcialmente la respuesta basal de NA, mientras que la inhibición de PKC no la reestableció; estos resultados no fueron concluyentes sobre el mecanismo de acción del PDGF sobre el  $\alpha_{1D}$ -AR, pero sugiere la participación de elementos adicionales.

### **Ensayos de fosforilación del receptor**

Los resultados anteriores demuestran que el receptor  $\alpha_{1D}$ -AR se desensibiliza debido a la activación de los receptores para EGF, PDGF e insulina y que esta desensibilización disminuye la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular mediada por el agonista. Por lo tanto, se determinó si la desensibilización era debida a la fosforilación del receptor. Para ello se realizó un ensayo de incorporación de  $^{32}P$  e inmunoprecipitación del receptor para determinar si éste es fosforilado debido a la estimulación con EGF, PDGF e insulina.

Se observó que al estimular con  $10\mu M$  NA el  $\alpha_{1D}$ -AR aumentó su fosforilación en  $\sim 250\%$  con respecto al basal (Fig. 5). Al estimular con EGF o PDGF también se observó una fosforilación del receptor, ligeramente superior a la observada con NA. Adicionalmente, al incubar con los inhibidores específicos para el EGFr, AG1478 o para el PDGFr, AG1976, y estimular con EGF y PDGF, respectivamente, la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR disminuyó de manera casi total.

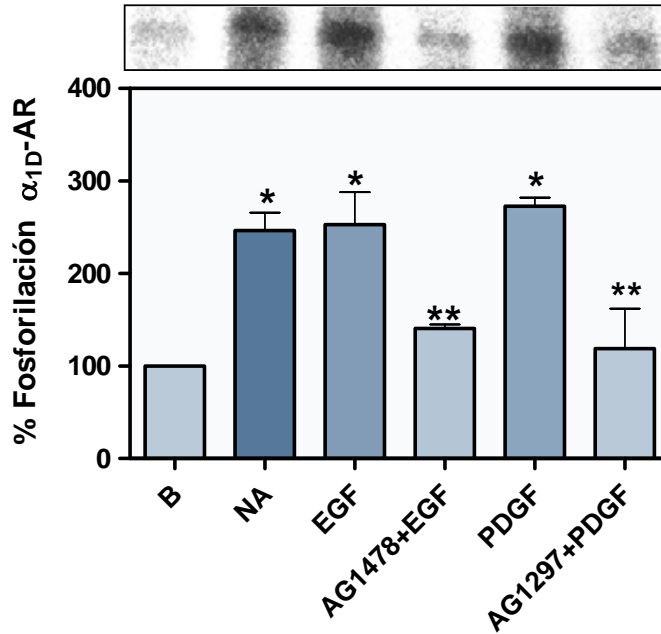
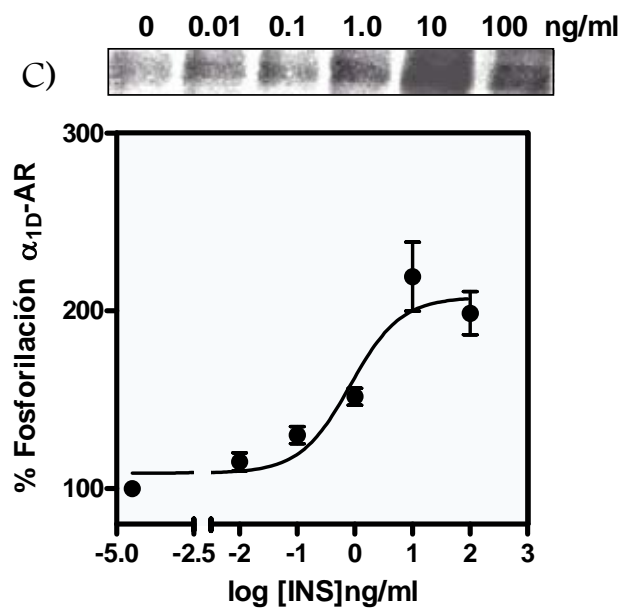
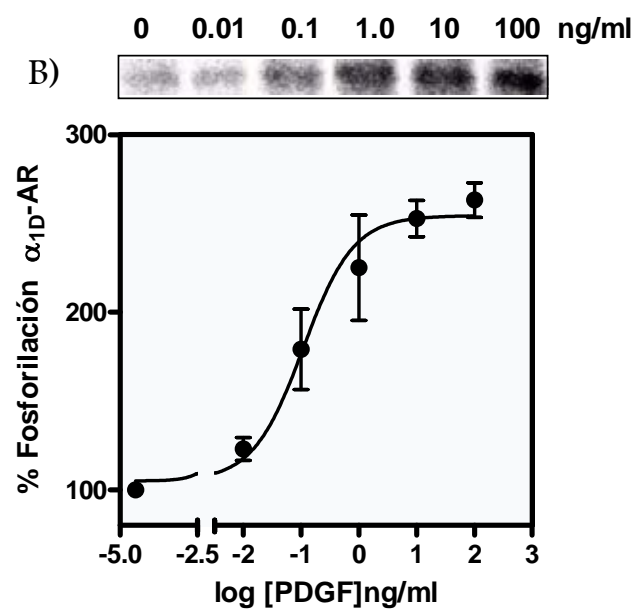
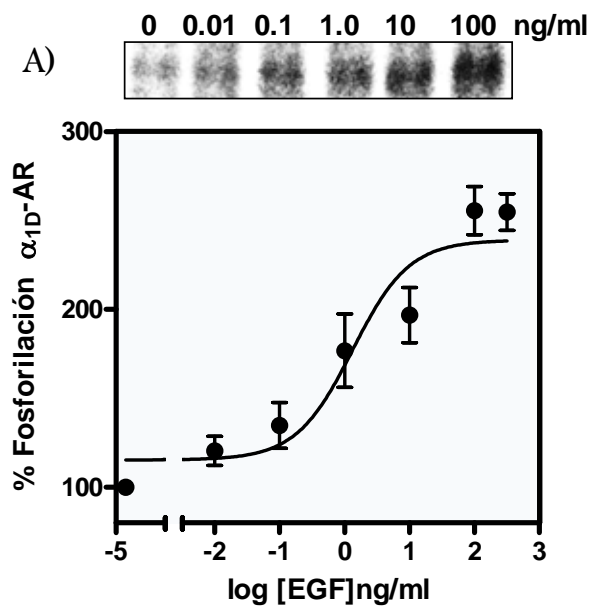


Fig. 5. Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR: Células Rat-1 marcadas con  $^{32}\text{P}$  fueron estimuladas con: NA  $10\mu\text{M}$  5 min., EGF  $100\text{ng/ml}$ , AG1478  $5\mu\text{M}$  30 min, NA  $10\mu\text{M}$  5 min, PDGF  $50\text{ng/ml}$ , 15 min., y AG1976  $5\mu\text{M}$  30 min., solos o en conjunto. \*  $P < 0.001$  vs. Basal, \*\*  $P > 0.05$  vs. Basal

Estos datos demuestran que tanto el EGF como el PDGF median la fosforilación del receptor  $\alpha_{1D}$ -AR y que ésta es debida a la activación de sus receptores.

Posteriormente, se determinó la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR con diferentes concentraciones de EGF, PDGF e insulina en curvas dosis-respuesta (Fig. 6). Los resultados obtenidos demuestran que la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR debida a la estimulación con EGF, PDGF e insulina es dosis-dependiente y saturable, lo cual sugiere que todos los receptores para los factores utilizados son activados, y que la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR observada es la máxima para cada factor.

Fig. 6. Curva dosis-respuesta de fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR: Células Rat-1 marcadas con  $^{32}\text{P}$  fueron estimuladas con: A) EGF 0, 0.01, 0.1, 1, 10 y  $100\text{ng/ml}$  15 min., B) PDGF 0, 0.01, 0.1, 1, 10 y  $100\text{ng/ml}$  15 min. y C) INS 0, 0.01, 0.1, 1, 10 y  $100\text{ng/ml}$  15 min.



Se calcularon los parámetros farmacodinámicos para cada curva, y se realizó el análisis estadístico. Se obtuvieron los siguientes datos:

	Potencia (EC50)	Efecto máximo (%)
EGF	~1.3 ng/ml	254.7%
PDGF	~0.1 ng/ml	262.8%
INSULINA	~0.8 ng/ml	198.2%

Se observa en la tabla que todos los tratamientos inducen la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR siendo el PDGF el más efectivo, mientras que la concentración a la cual se alcanza la mitad del efecto es variable, siendo el PDGF el factor más potente.

La siguiente estrategia experimental fue determinar si el EGF, PDGF e insulina median la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR a través de la activación de las cinasas PI3K y PKC, como se demostró en el ensayo funcional de liberación de  $Ca^{2+}$ . Para tal efecto, se utilizaron los inhibidores farmacológicos selectivos de ambas cinasas: estaurosporina (STAU) y bisindolilmaleimida I (BIM), inhibidores de PKC; y wortmanina (WORT) y LY294002 (LY), inhibidores de PI3K en el ensayo de fosforilación del receptor (Fig. 7).

Los resultados obtenidos demuestran lo siguiente: en el caso del tratamiento con EGF e insulina, la inhibición de PI3K y de PKC revierte la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR mediada por estos factores de manera significativa, implicando la participación de ambas cinasas en la fosforilación del receptor. El reestablecimiento del estado de fosforilación basal con el uso de los inhibidores (Fig. 7) sugiere que estas cinasas actúan de forma secuencial y no simultáneamente, lo cual correlaciona con los datos obtenidos en el ensayo de liberación de  $Ca^{2+}$ .

Sin embargo, en el caso del tratamiento con PDGF, el uso de inhibidores de la PKC revirtió sólo en forma parcial la fosforilación mediada por éste, datos que correlacionan con los obtenidos en el ensayo de liberación de  $Ca^{2+}$ , sin embargo, el uso de inhibidores de la PI3K tampoco revirtió la fosforilación mediada por PDGF. Estos datos son muy interesantes porque sugiere la participación de otras cinasas en la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR, además de mecanismos de acción distintos para los fenómenos de fosforilación y desensibilización.

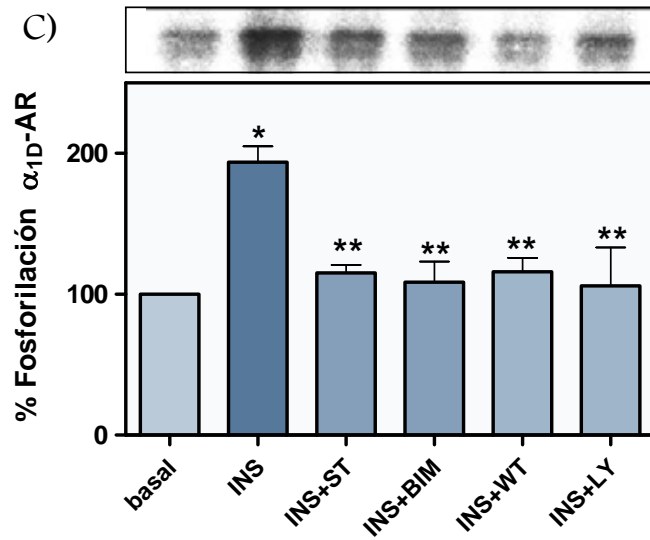
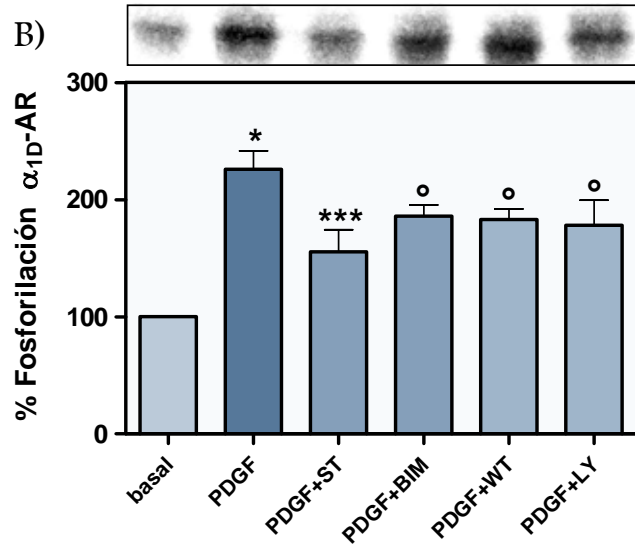
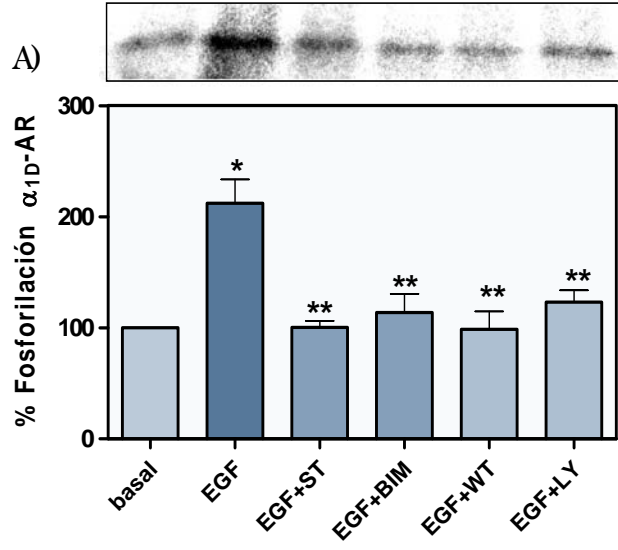




Fig. 7. Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR con inhibidores de la PKC y la PI3K: Células Rat-1 marcadas con  $^{32}\text{P}$  fueron estimuladas: wortmanina 100nM (WORT), LY 294002 1mM (LY), staurosporina 100nM (STAU) o BIM 1mM (BIM), 15 min. y en todos los casos con A) EGF 100ng/ml 15 min., B) PDGF 50ng/ml 15 min. y C) insulina 100ng/ml 15 min y NA 10 $\mu\text{M}$ . \*  $P < 0.001$  vs basal, \*\*  $P > 0.05$  vs basal, \*\*\*  $P < 0.05$  vs basal; °  $P > 0.05$  vs PDGF.

### **Tratamiento con toxina pertussis (PTX)**

Para determinar si la desensibilización del  $\alpha_{1D}$ -AR mediada por: EGF, PDGF e insulina involucra la transactivación de algún GPCR acoplado a proteínas  $G_i$  se utilizó la toxina pertussis (PTX), la cual inactiva selectivamente a estas proteínas G, en un ensayo de determinación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En este ensayo también se determinó el papel de otro factor probado con anterioridad en el laboratorio, el IGF-I, el cual es capaz de desensibilizar al  $\alpha_{1D}$ -AR (En prensa).

Los resultados obtenidos utilizando PTX fueron sorprendentes. La respuesta máxima obtenida de NA al incubar con PTX fue disminuida en ~50% en todos los casos (Fig. 8). Como control de la inhibición de  $G_i$  por PTX se utilizó ácido lisofosfatídico (LPA), debido a que éste lípido se acopla a  $G_i$  y es sensible a PTX

Se determinó entonces la respuesta de NA en los tratamientos con EGF, PDGF, insulina e IGF-I con PTX y en condiciones basales. Se realizó el análisis de los grupos tratados con PTX e incubados con EGF, PDGF, insulina e IGF-I vs. NA con PTX. De esta manera, se pudo observar que el tratamiento con PTX reestableció significativamente la respuesta del  $\alpha_{1D}$ -AR en el tratamiento con EGF, no así en los tratamientos con PDGF, insulina e IGF-I (Fig. 9). Estos datos sugieren que la desensibilización del  $\alpha_{1D}$ -AR mediada por EGF requiere de la activación de una proteína  $G_i$  o de un GPCR acoplado a ella.

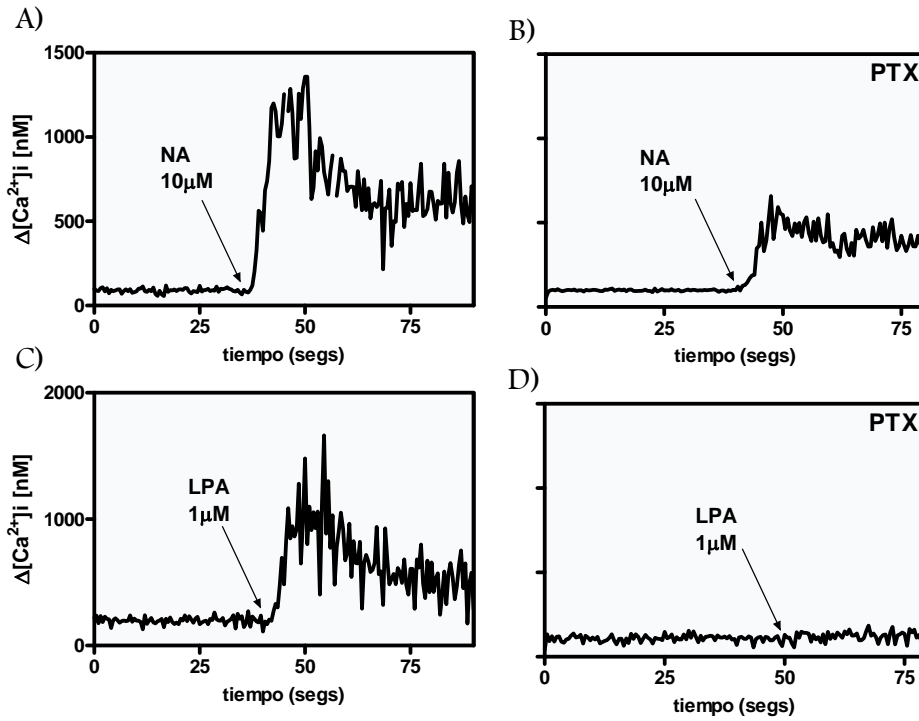


Fig. 8. Efecto de la PTX sobre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: Células Rat-1 cargadas con Fura2/AM y resuspendidas en medio Krebs-Ringer-  $\text{Ca}^{2+}$  fueron estimuladas con: A): Noradrenalina (NA)  $10\mu\text{M}$ , B): PTX  $100\text{ng/ml}$  o/n + NA  $10\mu\text{M}$ , C): LPA  $1\mu\text{M}$  y D): PTX  $100\text{ng/ml}$  o/n + LPA  $1\mu\text{M}$ .

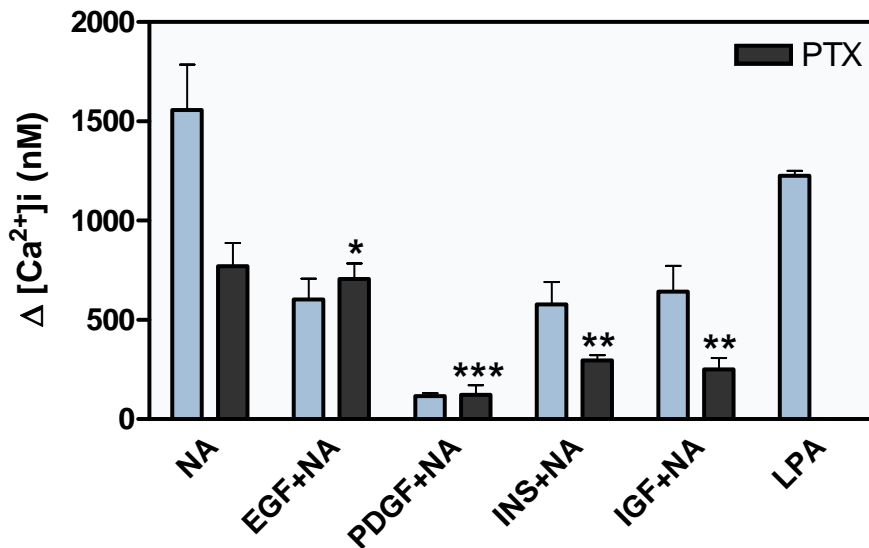


Fig. 9. Efecto de la PTX sobre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: Células Rat-1 fueron incubadas sin (barras claras) y con (barras oscuras) PTX  $100\text{ng/ml}$  o/n, sin estimular (NA), y estimuladas con: EGF  $100\text{ng/ml}$  15 min., PDGF  $50\text{ng/ml}$  15 min., insulina  $100\text{ng/ml}$  15 min e IGF-I  $100\text{ng/ml}$  15 min, y en todos los casos, estimuladas con NA  $10\mu\text{M}$ , y un grupo control con LPA  $1\mu\text{M}$ . \*  $P > 0.05$  vs NA-PTX, \*\*  $P < 0.05$  vs NA-PTX, \*\*\*  $P < 0.001$  vs NA-PTX.

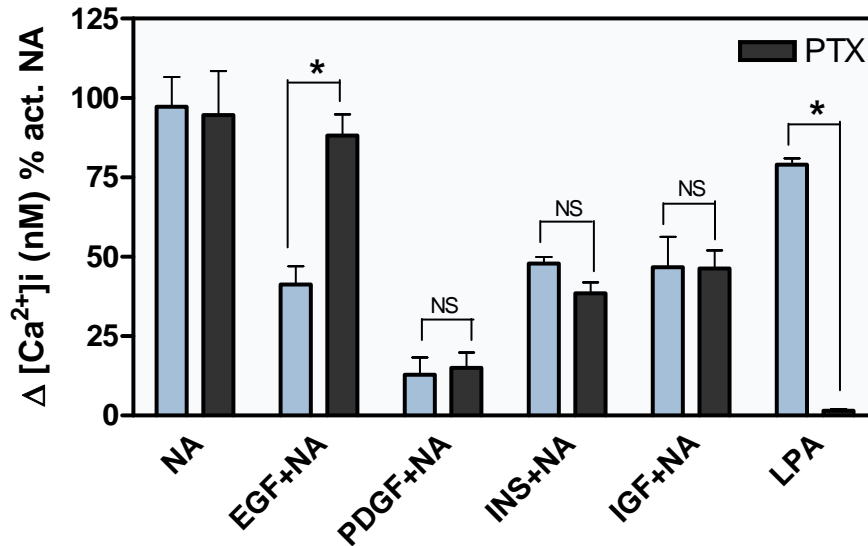


Fig. 10. Gráfica comparativa del efecto de la PTX sobre la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular: Se muestran los porcentajes de respuesta a NA  $10\mu M$  en células sin estimulación previa (NA) y estimuladas con EGF  $100ng/ml$  15 min., PDGF  $50ng/ml$  15 min. e insulina  $100ng/ml$  15 min, sin (barras claras) y con (barras oscuras) PTX. \*  $P < 0.001$  vs control.

Para poder realizar el análisis comparativo entre grupos con y sin tratamiento con PTX, se determinó el porcentaje de respuesta obtenida en cada grupo respecto a su grupo basal (NA) y se normalizaron las respuestas máximas de estos grupos como el 100% (Fig. 10). Se determinaron diferencias significativas en el tratamiento con PTX vs el grupo control sólo en el grupo tratado con EGF.

Posteriormente, se determinó la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR con tratamiento de toxina pertussis (PTX) para probar el papel de proteínas  $G_i$  en la fosforilación mediada por EGF, PDGF, insulina e IGF-I (Fig. 11).

Los resultados obtenidos muestran que la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR mediada por EGF y PDGF, es dependiente de una proteína  $G_i$  o de un receptor acoplado a ella; el tratamiento con PTX disminuyó la fosforilación mediada por estos factores de manera significativa. En el caso de la insulina y el IGF-I, la fosforilación fue parcialmente mediada por una proteína  $G_i$ , debido a que se encontraron diferencias significativas vs. los grupos control sin PTX y vs. el basal.

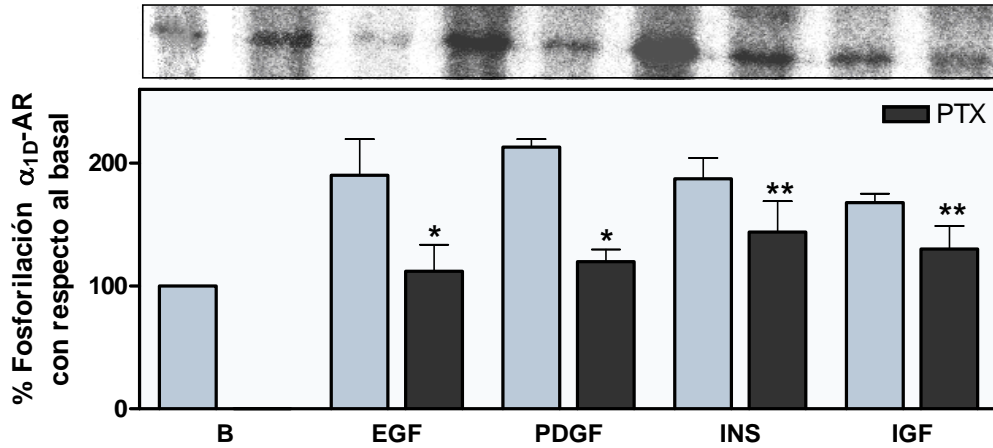


Fig. 11. Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR con PTX: Células Rat-1 marcadas con  $^{32}[P]$  sin y con tratamiento con PTX 100ng/ml o/n fueron estimuladas con: con EGF 100ng/ml 15 min., PDGF 50ng/ml, insulina 100ng/ml 15 min e IGF-I 100ng/ml 15 min.\*  $P > 0.05$  vs basal, \*\*  $P > 0.05$  vs basal y vs INS e IGF.

Como control de la inhibición de  $G_i$  por PTX se utilizó LPA para verificar la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR (Fig. 12). Se observa que el tratamiento con PTX abate la fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR mediada por este factor.

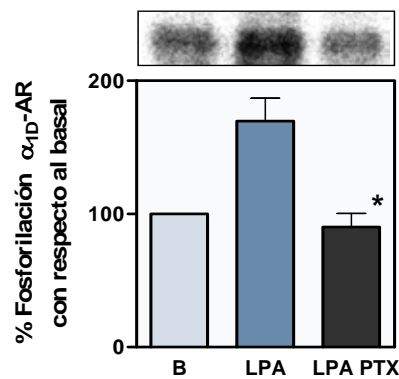


Fig. 12. Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ -AR por LPA: Células Rat-1 marcadas con  $^{32}[P]$  sin y con tratamiento con PTX 100ng/ml o/n fueron estimuladas con: LPA 1 $\mu$ M. \*  $P > 0.05$  vs basal

# **Discusión y Perspectivas**

---

Los datos presentados en esta tesis demuestran que la activación de los receptores de EGF, PDGF e insulina inducen la desensibilización y fosforilación del receptor  $\alpha_{1D}AR$  en fibroblastos Rat-1. Lo anterior se comprobó gracias a ensayos de cuantificación de la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular, y mediante ensayos de fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$ .

Mediante la determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  se estableció que el tratamiento con EGF, PDGF e insulina modifica la funcionalidad del receptor, manifestada por la disminución significativa de la liberación de este segundo mensajero promovida por su agonista la noradrenalina

Gracias a los ensayos de fosforilación del receptor  $\alpha_{1D}AR$  se determinó que el EGF, el PDGF y la insulina son capaces de fosforilar al receptor de forma dosis-dependiente y que esta fosforilación se previene en el caso del EGF y del PDGF con el uso de los inhibidores específicos de sus receptores.

A pesar de que la visión tradicional de la regulación de los GPCRs propone que la fosforilación del receptor lleva a su desensibilización funcional y que ambos mecanismos siempre correlacionan, algunos datos de esta tesis sugieren que esto no es una generalidad. Debido a que en el presente trabajo se determinó el papel de la activación de tres receptores con actividad de tirosina cinasa sobre la desensibilización y fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$ , vale la pena realizar un análisis de los resultados obtenidos con cada factor, y posteriormente, hacer una comparación entre los tres.

### **Desensibilización del $\alpha_{1D}AR$ mediada por EGF**

El tratamiento con 100 ng/ml de EGF por 15 minutos disminuyó la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular del  $\alpha_{1D}AR$  en respuesta a NA en un 43.3%. Al calcular los parámetros farmacodinámicos obtenidos de la curva dosis-respuesta de liberación de  $Ca^{2+}$  se determinó que la  $EC_{50}$  no se modificó significativamente vs el grupo sin tratamiento, lo cual sugiere que la desensibilización mediada por EGF se debe a mecanismos que modifican la capacidad del  $\alpha_{1D}AR$  para responder a la NA.

Basándose en reportes de la literatura y en trabajos previos realizados en el laboratorio, la hipótesis sobre el mecanismo de acción del EGF propuesta fue que éste promueve esta desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediante la activación cinasas

pertenecientes a su vía de transducción. Los primeros candidatos fueron la PI3K y la PKC, debido a que se ha demostrado su participación en la desensibilización del  $\alpha_{1B}AR$  mediada por el receptor de EGF.

Por lo tanto, se intentó determinar si la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por RTKs seguía el modelo de cross-talk propuesto en el laboratorio, en el cual el EGFr al ser estimulado activa a la PI3K, la cual activa a PKC, (probablemente mediante la activación previa de PDK1, aunque estos datos no han sido probados), y ésta finalmente, fosforila al receptor adrenérgico llevando a su desensibilización.

Para tal efecto, se utilizaron un par de inhibidores farmacológicos de cada cinasa y se determinó así su participación en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por EGF. El uso de todos los inhibidores reestableció la liberación de  $Ca^{2+}$  basal al estimular con NA. Esto sugiere que ambas cinasas actúan de forma secuencial para desensibilizar funcionalmente al  $\alpha_{1D}AR$  debido a la activación del EGFr.

Definida la desensibilización funcional del  $\alpha_{1D}AR$  por EGF, se determinó que ésta se debe a la fosforilación del receptor. El tratamiento con EGF 100 ng/ml por 15 minutos provocó la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  en 254.7% con respecto a la fosforilación sin estímulo, alcanzando el 50% del efecto con 1.3 ng/ml. Esta fosforilación se abatió con el uso del inhibidor del EGFr, lo cual demuestra que los efectos del EGF sobre el  $\alpha_{1D}AR$  son mediados por la activación específica del EGFr.

Tratando a las células con los inhibidores de PI3K y PKC utilizados previamente, la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por EGF se revirtió a los niveles basales. Estos datos muestran la participación de ambas cinasas en este proceso, lo cual correlaciona con los datos obtenidos en los ensayos de liberación de  $Ca^{2+}$ .

Posteriormente, se utilizó la toxina pertussis (PTX) para determinar si una proteína  $G_i$  o un receptor acoplado a ella participan en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$ , y se observó que la liberación de  $Ca^{2+}$  debida a NA se reestableció significativamente.

En los ensayos de fosforilación se observó que el tratamiento con PTX también abatió la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  provocada por el tratamiento con EGF. Estos datos sugieren un mecanismo novedoso por el cual la desensibilización y fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$

debida a la activación del EGFr requieren de una proteína  $G_i$  o un receptor acoplado a ella, de PI3K y de PKC, todas ellas participando de forma secuencial.

Existen varias posibilidades para explicar los resultados obtenidos y proponer un modelo de desensibilización mediado por EGF. En 1991 se reportó que el EGFr se acopla a una proteína  $G_i$  (Liang & Garrison, 1991). Posteriormente surgieron datos que vinculan a los dímeros  $G\beta\gamma$  de  $G_i$  con la activación directa de PI3K, y en el 2008 se publicó en el laboratorio una revisión extensiva sobre los mecanismos de desensibilización descritos de RTKs hacia receptores adrenérgicos, en los cuales  $G\beta\gamma$  de  $G_i$ , PI3K y PKC están involucradas (Hawes et al., 1996; García-Sáinz et al., En prensa).

Estos reportes, entre otros, apoyan el primer modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por EGF en el cual el EGFr al ser activado se fosforila y activa a una proteína  $G_i$ ; la liberación del dímero  $G\beta\gamma$  activa a PI3K, la cual activa a PKC, la cual finalmente fosforila al  $\alpha_{1D}AR$ . Esta fosforilación induce la desensibilización del receptor, y la disminución de su respuesta funcional. En este trabajo no se determinó si la PKC se activa debido a la PDK-1, una cinasa activada por el  $PIP_3$  (el segundo mensajero producido por la PI3K), pero parece ser el mecanismo más probable por el cual este fenómeno ocurre (Fig. 1).



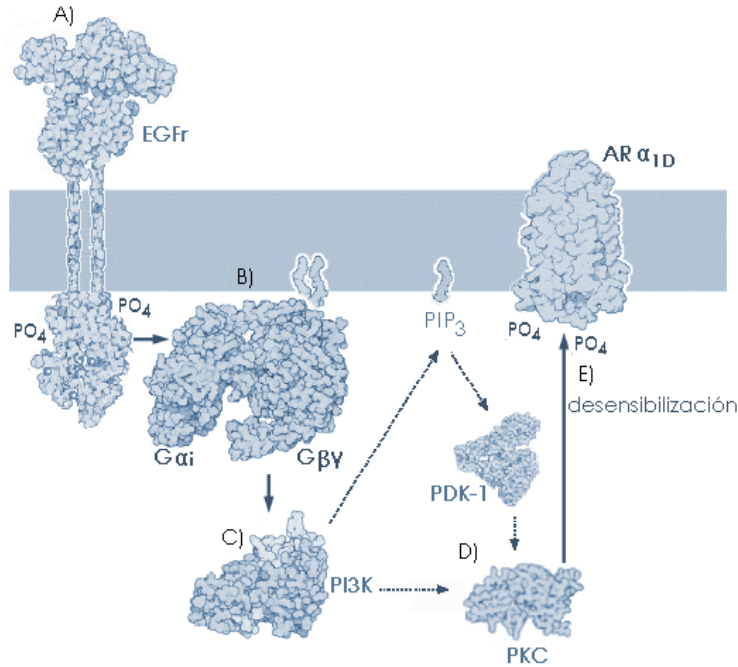


Fig. 1. 1er. modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}$ AR por la activación del EGFr. A) Activación del EGFr por EGF; B) Activación de G<sub>i</sub> en respuesta a la fosforilación del EGFr, disociación del dímero G $\beta\gamma$ ; C) Activación de la PI3K por G $\beta\gamma$ ; D) Activación de PKC debida a PI3K, se muestra como posible intermediario a PDK-1; E) Fosforilación del  $\alpha_{1D}$ AR y desensibilización funcional.

El segundo modelo que puede explicar los datos obtenidos con los inhibidores y la PTX se basa en reportes de que algunos RTKs como el PDGFr y el IGF-Ir transactivan al receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P<sub>1</sub>) acoplado a G<sub>i</sub>, mediante la activación de PI3K (Rani et al., 1997; Demoulin et al., 2004; El-Shewi et al., 2006). Con base en esta evidencia, es posible que el EGFr al ser activado transactive al S1P<sub>1</sub> o algún otro GPCR acoplado a G<sub>i</sub> mediante la activación de PI3K, y que ésta induzca la activación de PKC y la consecuente fosforilación y desensibilización del  $\alpha_{1D}$ AR (Fig. 2).

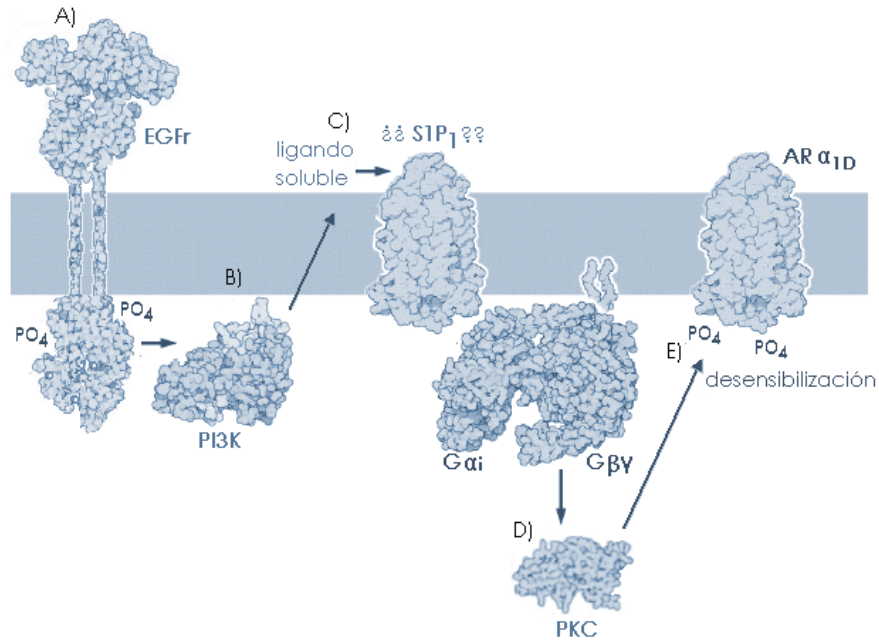


Fig. 2. 2do. modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del EGFr. A) Activación del EGFr por EGF; B) Activación de PI3K en respuesta a la fosforilación del EGFr; C) Liberación de ligando soluble de algún GPCR, posiblemente S1P<sub>1</sub> y activación del receptor D) Activación de PKC debida al GPCR; E) Fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  y desensibilización funcional.

### Desensibilización del $\alpha_{1D}AR$ mediada por PDGF

El tratamiento con 50 ng/ml de PDGF por 15 minutos disminuyó la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular en respuesta a NA del  $\alpha_{1D}AR$  en un 72.9%. Gracias a los parámetros farmacodinámicos obtenidos de la curva dosis-respuesta se determinó que al igual que el EGF, el PDGF no compite por el sitio de unión del agonista al  $\alpha_{1D}AR$ .

De igual forma que para el EGF, se determinó la participación de PI3K y PKC en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por PDGF. El uso de los inhibidores de la PI3K reestableció parcialmente, en un 49%, la liberación de  $Ca^{2+}$  al estimular con NA. Por otra parte, los inhibidores de PKC no reestablecieron la liberación de  $Ca^{2+}$  en respuesta a NA. Estos datos son novedosos e interesantes, pues demuestran que en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  debida al PDGFr, PKC no está involucrada y que PI3K participa conjuntamente con otra(s) cinasa(s).

Posteriormente, se estableció que la desensibilización funcional del  $\alpha_{1D}AR$  por PDGF es debida a la fosforilación del receptor. El tratamiento con PDGF 50 ng/ml por 15

minutos provocó la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  en 262.8% con respecto al basal y se alcanzó el 50% de la fosforilación máxima con 0.1 ng/ml. Esta fosforilación fue abatida con el uso del inhibidor del PDGFr, lo cual demuestra que los efectos de fosforilación y desensibilización observados sobre el  $\alpha_{1D}AR$  son mediados por la activación específica del PDGFr.

Se determinó entonces la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  debida al PDGF con el uso de los inhibidores de PKC y PI3K utilizados anteriormente. En este caso, los inhibidores de PKC revirtieron la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  en un 25%, y los inhibidores de PI3K un 20%. En el caso de la participación de PI3K, los datos correlacionan con los obtenidos en el ensayo de liberación de  $Ca^{2+}$ , debido a que se requiere de esta cinasa en conjunto con otra(s) para la fosforilación y desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$ . Sin embargo, el caso de la PKC es interesante debido a que su inhibición no disminuye la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por el PDGF, pero si disminuye ligeramente la fosforilación del receptor inducida por este factor. Para tratar de explicar estos datos es necesario tomar en cuenta los resultados que se discutirán a continuación.

Al realizar los ensayos de liberación de  $Ca^{2+}$  con el tratamiento de PTX, no se reestableció la liberación de  $Ca^{2+}$  por NA, lo cual indica que ninguna proteína  $G_i$  está involucrada en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por PDGF. Sin embargo, de manera sorprendente, el uso de PTX abatió la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  debida al PDGF. Estos datos podrían ser contradictorios si se toma el paradigma clásico de regulación de los GPCRs, por lo tanto, es necesario obviar éste para poder proponer un modelo de la regulación del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por el PDGFr con los datos obtenidos.

En primer lugar, la PI3K es capaz de fosforilar y desensibilizar al  $\alpha_{1D}AR$  en respuesta a PDGF sólo parcialmente, en un 20% y 30% respectivamente, lo cual indica que su papel no es determinante en esta vía, y que existen otros componentes de la cascada de señalización del PDGF involucrados en el proceso. El papel de la PKC no es claro debido a que no participa en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$ , pero su inhibición disminuye la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  debida al PDGF en un 25%. Lo último puede deberse a la activación independiente de PDGF de algunas isoformas de PKC que son capaces de fosforilar al  $\alpha_{1D}AR$ , sin que esta fosforilación tenga repercusiones sobre su desensibilización, sin embargo, no se tienen datos aún que den soporte experimental a esta propuesta.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el tratamiento con PTX son novedosos pero intrigantes, debido a que se requiere de una proteína  $G_i$  para la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  debida al PDGF, pero no se requiere ésta para la desensibilización funcional del receptor. Esto implica que estos dos procesos son independientes y deben considerarse por separado; además, es necesario tomar en cuenta que la fosforilación y desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por PDGF requiere probablemente de otra(s) cinasa(s) además de PI3K.

Por lo tanto, se propone un modelo con los datos obtenidos en este trabajo, considerando la desensibilización y la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  de forma independiente. Éste ha sido dividido en tres secciones.

I. La estimulación del PDGFr activa a la PI3K. Ésta es capaz de mediar la fosforilación “parcial” del  $\alpha_{1D}AR$  mediante la activación de una cinasa X que no es PKC. Esta fosforilación es capaz de desensibilizar al receptor, también de manera “parcial” (Fig. 3).

II. La estimulación del PDGFr lleva a la activación, independiente de PI3K, de una proteína  $G_i$  o de un receptor acoplado a ella, la cual es capaz de ocasionar la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  mediante una cinasa Y. Esta fosforilación no promueve la desensibilización del receptor (Fig. 4). En el laboratorio se reportó que en el caso del cross-talk del receptor de endotelina hacia el  $\alpha_{1B}AR$ , hay cinasa(s) de tirosina involucradas en la desensibilización heteróloga mediada por este factor, y que ésta(s) actúa(n) de forma independiente a cinasas como PKC (Vazquez-Prado et al., 1997).

III. La estimulación del PDGFr lleva a la activación, independiente de PI3K y de la proteína  $G_i$ , de una proteína Z, la cual es capaz de desensibilizar al  $\alpha_{1D}AR$  independientemente de su fosforilación. El mecanismo de acción de esta proteína podría estar río abajo del receptor y así actuar independientemente del estado de fosforilación de éste (Fig. 5). Datos no publicados de nuestro laboratorio con el receptor  $\alpha_{1A}AR$  confirman esta hipótesis.

En la Fig. 6 se muestra un esquema de cómo los diferentes elementos del modelo propuesto se conjugan en la respuesta final, ya sea la fosforilación, la desensibilización, o ambas, del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por la activación del PDGFr (Fig. 6).

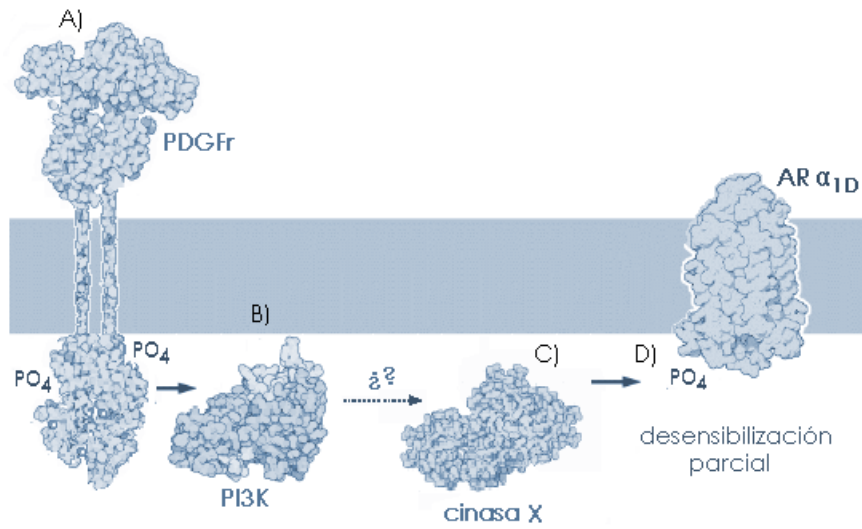


Fig. 3. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del PDGFr I. A) Activación del PDGFr por PDGF; B) Activación de PI3K en respuesta a la fosforilación del PDGFr; C) Activación de la cinasa X D) Fosforilación "parcial" del  $\alpha_{1D}AR$  y desensibilización funcional "parcial".

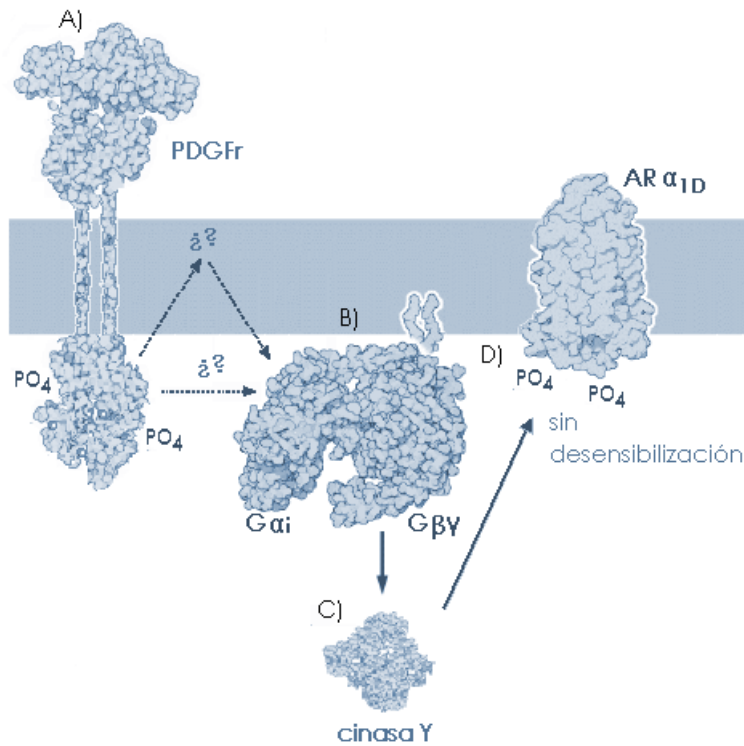


Fig. 4. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del PDGFr II. A) Activación del PDGFr por PDGF; B) Activación de G; C) Activación de la cinasa Y; D) Fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  sin desensibilización funcional.

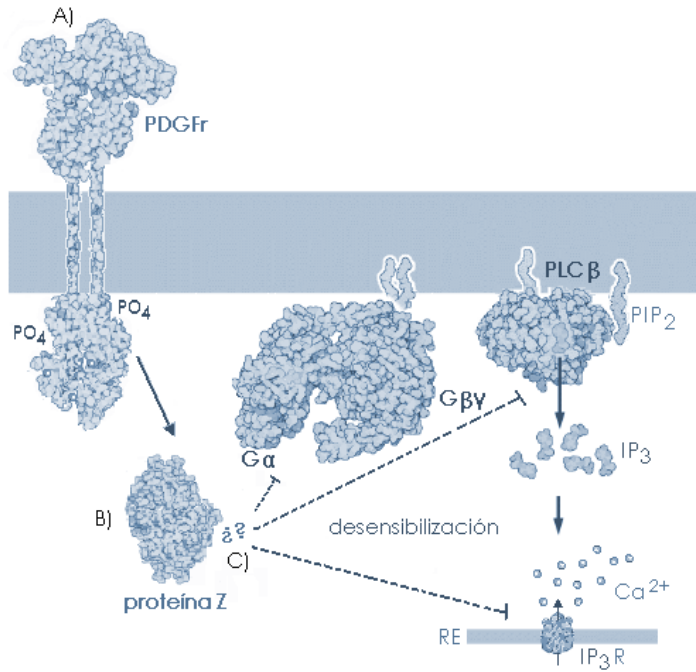


Fig. 5. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}$ AR por la activación del PDGFr III. A) Activación del PDGFr por PDGF; B) Activación de la proteína Z en respuesta a la fosforilación del PDGFr; C) Desensibilización funcional del  $\alpha_{1D}$ AR mediante algún mecanismo río abajo del receptor.

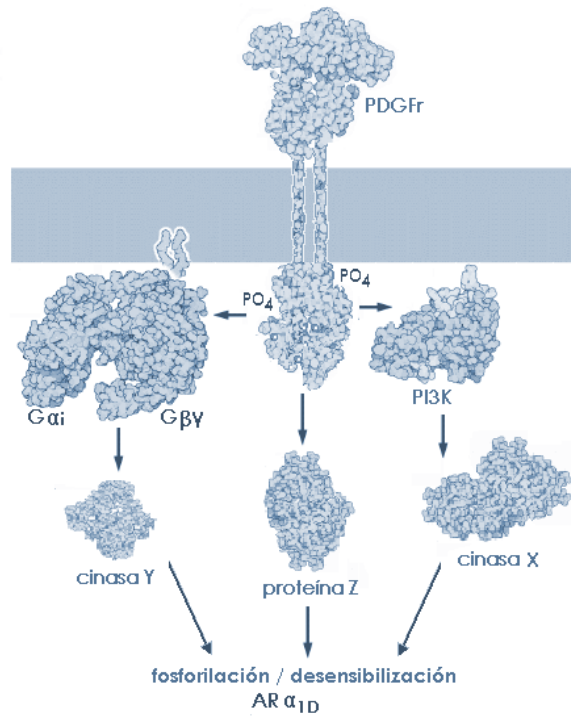


Fig. 6. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}$ AR por la activación del PDGFr III. Se muestran las tres vías independientes propuestas: G $_i$  y una cinasa Y; una proteína Z activada directamente por el PDGFr; PI3K y una cinasa X.

## **Desensibilización del $\alpha_{1D}AR$ mediada por Insulina**

El tratamiento con 100 ng/ml de insulina por 15 minutos disminuyó la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular en respuesta a NA del  $\alpha_{1D}AR$  en un 48.7%. Gracias a los parámetros farmacodinámicos obtenidos de la curva dosis-respuesta se determinó que al igual que los demás factores probados, la insulina no compite por el sitio de unión del agonista del  $\alpha_{1D}AR$ .

Igualmente, se determinó la participación de PI3K y PKC en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por insulina. El uso de los inhibidores de la PI3K y la PKC reestableció significativamente la liberación de  $Ca^{2+}$  al estimular con NA. Esto sugiere que ambas cinasas actúan de forma secuencial para desensibilizar funcionalmente al  $\alpha_{1D}AR$  debido a la activación del receptor de insulina.

Posteriormente, se determinó que la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por la insulina es debida a la fosforilación del receptor. El tratamiento con insulina 100 ng/ml por 15 minutos provocó la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  en 198.2% con respecto a la fosforilación basal, alcanzando el 50% del efecto con 0.8 ng/ml.

Tratando con los inhibidores de PI3K y PKC utilizados previamente, la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  mediada por insulina se revirtió. Estos datos muestran la participación de ambas cinasas en este proceso, lo cual correlaciona con los datos obtenidos en los ensayos de liberación de  $Ca^{2+}$ .

Al realizar los ensayos de liberación de  $Ca^{2+}$  con el tratamiento de PTX, no se reestableció la liberación de  $Ca^{2+}$  por NA, lo cual indica que ninguna proteína  $G_i$  está involucrada en la desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por insulina. Por otro lado, en los ensayos de fosforilación, se observó que el tratamiento con PTX revirtió parcialmente la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  provocada por el tratamiento con insulina, lo cual indica que se requiere de una proteína  $G_i$  en cooperación con otras cinasas para la fosforilación del receptor.

Estos datos sugieren que se requiere de una proteína  $G_i$  o de un receptor acoplado a ella, de PI3K y de PKC para la fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  debida a la insulina; sin embargo, no se requiere de una proteína  $G_i$  para la desensibilización del receptor,

siendo indispensables para este proceso PI3K y PKC. Adicionalmente, la participación de una proteína  $G_i$  en la fosforilación del receptor parece ser parcial, por lo que se sugiere el siguiente modelo de fosforilación y desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por insulina, en el cual la activación del receptor de insulina induce su fosforilación y la unión y fosforilación del IRS. Esta proteína induce la activación de la PI3K, la cual activa a PKC; y de manera paralela, se activa una proteína  $G_i$  o un receptor acoplado a ella, la cual es capaz de estimular también a PI3K, la cual activa a PKC. Esta cinasa activada por las “dos vías distintas” es la cinasa que finalmente fosforila y desensibiliza al  $\alpha_{1D}AR$  (Fig. 7). En este modelo, la inhibición de la proteína  $G_i$  no tiene efectos sobre la desensibilización del receptor debido a que la PI3K se activa de manera directa por el receptor de insulina y el efecto funcional es la desensibilización del receptor.

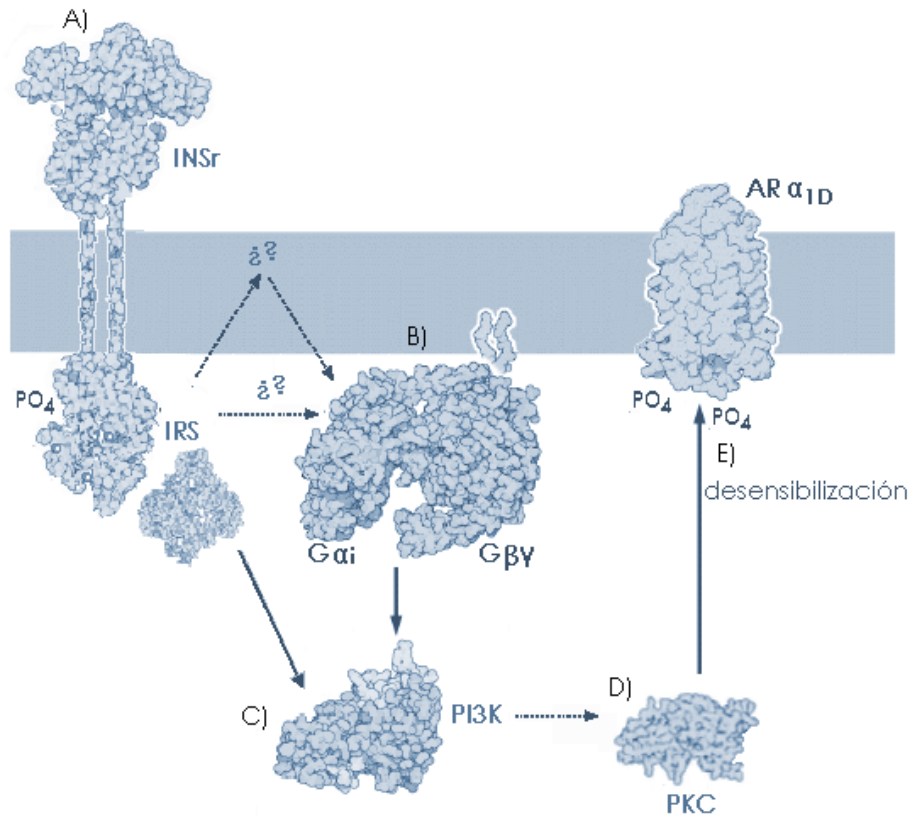


Fig. 7. Modelo de desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  por la activación del receptor de insulina. A) Activación del INSr por insulina, unión y activación de IRS; B) Activación de  $G_i$  en respuesta a la fosforilación del ENSR, activación de la PI3K por  $G\beta\gamma$  C) Simultánea a la activación de  $G_i$ , activación de la PI3K por el INSr; D) Activación de PKC debida a PI3K; E) Fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  y desensibilización funcional.



## **Conclusiones y perspectivas**

Los datos presentados en esta tesis demuestran que la activación de los receptores de EGF, PDGF e insulina inducen la desensibilización y fosforilación del receptor  $\alpha_{1D}AR$ . A pesar de que los componentes de las vías de señalización involucrados en estos procesos son los mismos para los tres factores probados, el mecanismo y la respuesta final son distintos.

Los resultados obtenidos permiten hacer un análisis cuantitativo entre los diferentes factores probados. Como se mostró en las tablas de los parámetros farmacodinámicos obtenidos, la desensibilización funcional del  $\alpha_{1D}AR$  debida al PDGF fue mayor y mostró diferencias significativas con respecto a la debida al EGF y a la insulina. Esta desensibilización tan dramática debida al PDGF puede deberse al mecanismo “alterno” de bloqueo de la liberación de  $Ca^{2+}$  mencionado en el modelo III propuesto en este capítulo.

Los efectos máximos de fosforilación del  $\alpha_{1D}AR$  también reflejan diferencias entre los factores probados, siendo el PDGF el que logró la mayor fosforilación del receptor e insulina la menor. Otro punto a considerar es la potencia de los factores utilizados. Mientras que se requirió 1.3 ng/ml de EGF y 0.8 ng/ml de insulina para lograr el 50% de la fosforilación máxima del  $\alpha_{1D}AR$ , se requirió sólo 0.1 ng/ml de PDGF para lograr el mismo efecto.

Una conclusión importante que arrojan los datos de este trabajo es que deben evitarse las generalizaciones sobre los mecanismos de acción de receptores similares o de la misma familia, debido a que a pesar de las similitudes que existan en la estructura, los ligandos, las vías de señalización que activan, etc., los resultados funcionales pueden ser muy distintos. Estas diferencias tienen implicaciones celulares muy importantes, debido a que brindan gran diversidad de respuestas biológicas a diferentes estímulos.

Adicionalmente, este trabajo representa uno de los primeros reportes sobre la regulación heteróloga del receptor  $\alpha_{1D}AR$ , lo que permite hacer análisis comparativos entre los diferentes miembros de la familia de los  $\alpha_1ARs$ . La información obtenida sobre los mecanismos moleculares involucrados en procesos de fosforilación y desensibilización del receptor mediada por otros factores, ayudan a tener un panorama más completo y global de mecanismos de regulación de los  $\alpha_1ARs$ .

Como parte del trabajo futuro para completar los modelos propuestos en esta tesis se podría considerar, entre otras estrategias, lo siguiente:

I. Determinar el mecanismo por el cual PI3K activa a PKC en el estímulo con EGF, PDGF e insulina. Determinar la posible participación de PDK-1 como mediadora de este proceso.

II. Identificar a la(s) isoforma(s) específicas de PKC que fosforilan al  $\alpha_{1D}AR$  en respuesta a la activación de EGF e insulina, y los sitios específicos que son fosforilados en el receptor.

III. Establecer el mecanismo de acción de la proteína  $G_i$  involucrada en la desensibilización mediada por los factores probados. Determinar si es sólo la proteína  $G_i$  unida a los RTKs, o la transactivación de un GPCR acoplado a ella lo que promueve los efectos observados en este trabajo. Establecer la secuencia de participación de ésta con PI3K y PKC. Identificación de la posible cinasa desconocida activada por  $G_i$  en respuesta al estímulo con PDGF.

IV. Determinar la molécula y el mecanismo por el cual el PDGF desensibiliza al  $\alpha_{1D}AR$ , y a que nivel de su cascada de transducción.

V. Establecer si existe transactivación de otros RTKs involucrada en alguno de los procesos de fosforilación y desensibilización del  $\alpha_{1D}AR$  con todos los factores estudiados.

Finalmente, otro de los aspectos importantes obtenidos en este trabajo de tesis, fue el descubrimiento de que el tratamiento con PTX disminuye la liberación de  $Ca^{2+}$  del  $\alpha_{1D}AR$  debida a NA. Estos resultados fueron sorprendentes, y dejan abierta una serie de preguntas, y propuestas experimentales para determinar cual es el papel de la proteína  $G_i$  en la actividad y/o regulación del  $\alpha_{1D}AR$ .

Por lo tanto, con los datos obtenidos de esta tesis no es posible proponer explicaciones sobre este fenómeno, y para poder proponer un modelo razonable del mecanismo que promueve estos efectos celulares es necesario el planteamiento de nuevos objetivos experimentales y de un nuevo proyecto de investigación.

# **Referencias**

---

Adams, P. D., I. T. Arkin, et al. (1995). *Nat Struct Biol.* 2(2): 154-62.

Ahlquist, R. P. (1962). *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 139: 38-41.

Ahlquist, R. P. (1966). *J Pharm Sci.* 55(4): 359-67.

Ahlquist, R. P. (1967). *Ann N Y Acad Sci.* 139(3): 549-52.

Akiyama, T., T. Kadooka, et al. (1986). *Arch Biochem Biophys.* 245(2): 531-6.

Akiyama, T., T. Kadowaki, et al. (1986). *J Biol Chem.* 261(31): 14797-803.

Alderton, F., B. Sambhi, et al. (2001). *Br J Pharmacol.* 134(1): 6-9.

Antoniades, H. N., D. Stathakos, et al. (1975). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(7): 2635.

Antoniades, H. N., C. D. Scher, et al. (1979). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(4): 1809.

Bajaj, M., M. D. Waterfield, et al. (1987). *Biochim Biophys Acta.* 916(2): 220-6.

Barber, M. A., S. Donald, et al. (2007). *J Biol Chem.* 282(41): 29967-76. Epub 2007.

Barger, G. and H. H. Dale (1910). *J Physiol.* 41(1-2): 19-59.

Bellacosa, A., J. R. Testa, et al. (1991). *Science.* 254(5029): 274-7.

Benovic, J. L. and J. Gomez (1993). *J Biol Chem.* 268(26): 19521-7.

Benovic, J. L., L. J. Pike, et al. (1985). *J Biol Chem.* 260(11): 7094-101.

Benovic, J. L., R. H. Strasser, et al. (1986). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(9): 2797-801.

Benovic, J. L., F. Mayor, Jr., et al. (1986). *Nature.* 321(6073): 869-72.

Benovic, J. L., H. Kuhn, et al. (1987). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(24): 8879-82.

Benovic, J. L., J. W. Regan, et al. (1987). *J Biol Chem.* 262(36): 17251-3.

Benovic, J. L., A. DeBlasi, et al. (1989). *Science.* 246(4927): 235-40.

Benovic, J. L., J. J. Onorato, et al. (1991). *J Biol Chem.* 266(23): 14939-46.

Berthelsen, S. and W. A. Pettinger (1977). *Life Sci.* 21(5): 595-606.

Biden, T. J., M. Prentki, et al. (1984). *Biochem J.* 223(2): 467-73.

Birnbaumer, L. (1992). *Cell.* 71(7): 1069-72.

Blackmore, P. F., B. P. Hughes, et al. (1983). *J Biol Chem.* 258(17): 10488-94.

Bouvier, M., L. M. Leeb-Lundberg, et al. (1987). *J Biol Chem.* 262(7): 3106-13.

Brown, G. L. and J. S. Gillespie (1957). *J Physiol.* 138(1): 81-102.

Burkholder, A. C. and L. H. Hartwell (1985). *Nucleic Acids Res.* 13(23): 8463-75.

Buss, J. E., S. M. Mumby, et al. (1987). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(21): 7493-7.

Cadenas, E., H. Kaji, et al. (1961). *J Biol Chem.* 236: PC63-PC64.

Camps, M., A. Carozzi, et al. (1992). *Nature.* 360(6405): 684-6.

Camps, M., C. Hou, et al. (1992). *Eur J Biochem.* 206(3): 821-31.

Cannon, W. B. (1933). *Science.* 78(2012): 43-48.

Casas-Gonzalez, P. and J. A. Garcia-Sainz (2006). *Eur J Pharmacol.* 542(1-3): 31-6.

Casas-Gonzalez, P., J. Vazquez-Prado, et al. (2000). *Mol Pharmacol.* 57(5): 1027-33.

Casas-Gonzalez, P., A. Ruiz-Martinez, et al. (2003). *Biochim Biophys Acta.* 1633(2).

Cassel, D. and Z. Selinger (1977). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(8): 3307-11.

Cassel, D., H. Levkovitz, et al. (1977). *J Cyclic Nucleotide Res.* 3(6): 393-406.

Chan, A. C., M. Iwashima, et al. (1992). *Cell.* 71(4): 649-62.

Clapham, D. E. and E. J. Neer (1993). *Nature.* 365(6445): 403-6.

Clark, R. B. and R. W. Butcher (1979). *J Biol Chem.* 254(19): 9373-8.

Clark, R. B., K. A. Gration, et al. (1979). *J Physiol.* 295: 93P-94P.

Cohen, S. (1960). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 46(3): 302-11.

Cohen, S. (1965). *Dev Biol.* 12(3): 394-407.

Cohen, S. (1983). *Cancer.* 51(10): 1787-91.

Cohen, S. (1997). *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2(2): 93-6.

Cohen, S. (2004). *Ann N Y Acad Sci.* 1038: 98-102.

Cohen, S., G. Carpenter, et al. (1980). *J Biol Chem.* 255(10): 4834-42.

Cohen, S., H. Ushiro, et al. (1982). *J Biol Chem.* 257(3): 1523-31.

Cooper, D. M. (1982). *FEBS Lett.* 138(2): 157-63.

Corvera, S. and J. A. Garcia-Sainz (1984). *Biochem Biophys Res Commun.* 119(3).

Corvera, S., S. M. Hernandez-Sotomayor, et al. (1984). *Biochim Biophys Acta.* 803.

Corvera, S., K. R. Schwarz, et al. (1986). *J Biol Chem.* 261(2): 520-6.

Coughlan, S. and G. Hind (1987). *J Biol Chem.* 262(17): 8402-8.

Cuatrecasas, P. (1971). *J Biol Chem.* 246(23): 7265-74.

Cuatrecasas, P. (1972). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69(5): 1277-81.

Cuatrecasas, P. (1972). *J Biol Chem.* 247(7): 1980-91.

Cuatrecasas, P. (1972). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69(2): 318-22.

Czech, M. P. and J. Massague (1982). *Fed Proc.* 41(11): 2719-23.

Dale, H. H. (1906). *J Physiol.* 34(3): 163-206.

Dalle, S., T. Imamura, et al. (2002). *Mol Cell Biol.* 22(17): 6272-85.

Das, M., T. Miyakawa, et al. (1977). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(7): 2790-4.

Datta, K., T. F. Franke, et al. (1995). *Mol Cell Biol.* 15(4): 2304-10.

Datta, K., A. Bellacosa, et al. (1996). *J Biol Chem.* 271(48): 30835-9.

Daub, H., F. U. Weiss, et al. (1996). *Nature.* 379(6565): 557-60.

Delcourt, N., J. Bockaert, et al. (2007). *Trends Pharmacol Sci.* 28(12): 602-7.

Demoulin J., J. Ericsson, et al. (2004). *J Biol Chem.* 279: 19732-8.

Dietrich, A., M. Meister, et al. (1992). *FEBS Lett.* 313(3): 220-4.

Diviani, D., A. L. Lattion, et al. (1997). *J Biol Chem.* 272(45): 28712-9.

Dixon, R. A., B. K. Kobilka, et al. (1986). *Nature.* 321(6065): 75-9.

Drake, M. T., S. K. Shenoy, et al. (2006). *Circ Res.* 99(6): 570-82.

Ebina, Y., M. Edery, et al. (1985). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(23): 8014-8.

Ebina, Y., L. Ellis, et al. (1985). *Cell.* 40(4): 747-58.

El-Shewy, H. M., K. R. Johnson, et al. (2006). *J Biol Chem.* 281(42): 31399-407.

Enero, M. A., S. Z. Langer, et al. (1972). *Br J Pharmacol.* 44(4): 672-88.

Fain, J. N. and J. A. Garcia-Sainz (1980). *Life Sci.* 26(15): 1183-94.

Flier, J. S., C. R. Kahn, et al. (1977). *J Clin Invest.* 60(4): 784-94.

Fong, C. T., L. Silver, et al. (1962). *Biochim Biophys Acta.* 56: 190-2.

Forray, C., J. A. Bard, et al. (1994). *Mol Pharmacol.* 45(4): 703-8.

Franke, T. F., S. I. Yang, et al. (1995). *Cell.* 81(5): 727-36.

Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). *Mol Pharmacol.* 63(6): 1256-72.

Furchgott, R. F. (1967). *Ann N Y Acad Sci.* 139(3): 553-70.

Gales, C., R. V. Rebois, et al. (2005). *Nat Methods.* 2(3): 177-84. Epub 2005 Feb 17.

Gales, C., J. J. Van Durm, et al. (2006). *Nat Struct Mol Biol.* 13(9): 778-86.

Garcia-Sainz, J. A. (1981). *FEBS Lett.* 126(2): 306-8.

Garcia-Sainz, J. A. (1995). *Arch Med Res.* 26(3): 205-12.

Garcia-Sainz, J. A. and J. N. Fain (1980). *Mol Pharmacol.* 18(1): 72-7.

Garcia-Sainz, J. A. and S. M. Hernandez-Sotomayor (1987). *Eur J Biochem.* 163(2).

Garcia-Sainz, J. A. and M. E. Torres-Padilla (1999). *FEBS Lett.* 443(3): 277-81.

Garcia-Sainz, J. A. and R. Villalobos-Molina (2004). *Eur J Pharmacol.* 500(1-3): 113.

Garcia-Sainz, J. A., A. K. Hasler, et al. (1980). *Biochem Pharmacol.* 29(24): 3330-3.

Garcia-Sainz, J. A., R. Villalobos-Molina, et al. (1985). *Eur J Pharmacol.* 112(3): 393.

Garcia-Sainz, J. A., J. Vazquez-Prado, et al. (1999). *Arch Med Res.* 30(6): 449-58.

Garcia-Sainz, J. A., J. Vazquez-Prado, et al. (2000). *Eur J Pharmacol.* 389(1): 1-12.

Garcia-Sainz, J. A., F. G. Vazquez-Cuevas, et al. (2001). *Biochem J.* 353(Pt 3): 603-10.

Garcia-Sainz, J. A., C. E. Rodriguez-Perez, et al. (2004). *Biochem Pharmacol.* 67(10).

Garcia-Sainz, J. A., M. T. Romero-Avila, et al. (2004). *Life Sci.* 75(16): 1937-47.

Garrett, T. P., N. M. McKern, et al. (2002). *Cell.* 110(6): 763-73.

Gibson, T. J., M. Hyvonen, et al. (1994). *Trends Biochem Sci.* 19(9): 349-53.

Giorgetti, S., R. Ballotti, et al. (1993). *J Biol Chem.* 268(10): 7358-64.

Glenn, K., D. F. Bowen-Pope, et al. (1982). *J Biol Chem.* 257(9): 5172-6.

Goel, R., P. J. Phillips-Mason, et al. (2004). *J Biol Chem.* 279(8): 6701-10.

Gonzalez-Espinosa, C., D. Gonzalez-Espinosa, et al. (1999). *Eur J Pharmacol.* 384.

Graber, S. G., R. A. Figler, et al. (1992). *J Biol Chem.* 267(2): 1271-8.

Graf, R., R. Mattera, et al. (1992). *J Biol Chem.* 267(34): 24307-14.

Gullis, R. J. and C. E. Rowe (1973). *Biochem Soc Trans.* 1(4): 849.

Hagen, D. C., G. McCaffrey, et al. (1986). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(5): 1418-22.

Han, C., P. W. Abel, et al. (1987). *Mol Pharmacol.* 32(4): 505-10.

Harden, T. K. (1983). *Pharmacol Rev.* 35(1): 5-32.

Harden, T. K., C. U. Cotton, et al. (1980). *Science.* 210(4468): 441-3.

Hawes, B. E., L. M. Luttrell, et al. (1996). *J Biol Chem.* 271(21): 12133-6.

Heldin, C. H., B. Westermark, et al. (1981). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(6): 3664-8.

Heldin, C. H., A. Wasteson, et al. (1982). *J Biol Chem.* 257(8): 4216-21.

Heldin, C. H., B. Ek, et al. (1983). *J Biol Chem.* 258(16): 10054-61.

Hertel, C., M. Portenier, et al. (1986). *J Cell Biochem* 30(3): 219-25.

Hescheler, J., W. Rosenthal, et al. (1987). *Nature.* 325(6103): 445-7.

Heuser, J. (1989). *Cell Biol Int Rep.* 13(12): 1063-76.

Higashijima, T., K. M. Ferguson, et al. (1987). *J Biol Chem.* 262(2): 762-6.

Higashiyama, S., J. A. Abraham, et al. (1991). *Science.* 251(4996): 936-9.

Higashiyama, S., K. Lau, et al. (1992). *J Biol Chem.* 267(9): 6205-12.

Hildebrandt, J. D. and L. Birnbaumer (1983). *J Biol Chem.* 258(21): 13141-7.

Hildebrandt, J. D., J. Codina, et al. (1984). *J Biol Chem.* 259(4): 2039-42.

Hildebrandt, J. D., R. D. Sekura, et al. (1983). *Nature.* 302(5910): 706-9.

Hollenberg, M. D. and P. Cuatrecasas (1973). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(10): 2964.

Hubbard, S. R. and J. H. Till (2000). *Annu Rev Biochem* 69: 373-98.

Hurley, J. B. (1990). *Biochem Soc Symp* 56: 81-4.

Jacobs, S., E. Hazum, et al. (1979). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(10): 4918-21.

Jenness, D. D., A. C. Burkholder, et al. (1983). *Cell.* 35(2 Pt 1): 521-9.

Jonson, C. and L. Fandriks (1987). *Acta Physiol Scand.* 130(3): 387-91.

Joost, H. G. (1995). *Cell Signal.* 7(2): 85-91.

Kant, S., S. Schumacher, et al. (2006). *J Biol Chem.* 281(46): 35511-9.

Kasuga, M., E. Van Obberghen, et al. (1982). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(6): 1864-8.

Kasuga, M., Y. Zick, et al. (1982). *J Biol Chem.* 257(17): 9891-4.

Kasuga, M., Y. Zick, et al. (1982). *Nature.* 298(5875): 667-9.

Katada, T. and M. Ui (1981). *J Biol Chem.* 256(16): 8310-7.

Kato, Y., V. V. Kravchenko, et al. (1997). *Embo J.* 16(23): 7054-66.

Kobilka, B. K., T. Frielle, et al. (1987). *Nature.* 329(6134): 75-9.

Koch, C. A., D. Anderson, et al. (1991). *Science.* 252(5006): 668-74.

Kohler, N. and A. Lipton (1974). *Exp Cell Res.* 87(2): 297-301.

Kohout, T. A. and R. J. Lefkowitz (2003). *Mol Pharmacol.* 63(1): 9-18.

Kramarcy, N. R., A. Vidal, et al. (1994). *J Biol Chem.* 269(4): 2870-6.

Kuhn, H. and W. J. Dreyer (1972). *FEBS Lett.* 20(1): 1-6.

Kunapuli, P. and J. L. Benovic (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(12): 5588-92.

Kyriakis, J. M., H. App, et al. (1992). *Nature.* 358(6385): 417-21.

Lad, P. M., T. B. Nielsen, et al. (1980). *J Biol Chem.* 255(22): 10841-6.

Lad, P. M., T. B. Nielsen, et al. (1980). *FEBS Lett.* 122(2): 179-83.

Lambright, D. G., J. Sondek, et al. (1996). *Nature.* 379(6563): 311-9.

Lammers, R., E. Van Obberghen, et al. (1990). *J Biol Chem.* 265(28): 16886-90.

Lands, A. M., A. Arnold, et al. (1967). *Nature.* 214(5088): 597-8.

Lands, A. M., F. P. Luduena, et al. (1967). *Life Sci.* 6(21): 2241-9.

Langer, S. Z. and M. L. Dubocovich (1977). *Eur J Pharmacol.* 41(1): 87-8.

Lees-Miller, S. P. and C. W. Anderson (1989). *J Biol Chem.* 264(29): 17275-80.

Lefkowitz, R. J. (1998). *J Biol Chem.* 273(30): 18677-80.

Lefkowitz, R. J., J. Pitcher, et al. (1998). *Adv Pharmacol* 42: 416-20.

Leterrier, J. F., R. K. Liem, et al. (1981). *J Cell Biol.* 90(3): 755-60.

Lioubin, M. N., G. M. Myles, et al. (1994). *Mol Cell Biol.* 14(9): 5682-91.

Lohse, M. J., R. J. Lefkowitz, et al. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(9): 3011-5.

Lohse, M. J., J. L. Benovic, et al. (1990). *Science.* 248(4962): 1547-50.

Lomasney, J. W., S. Cotecchia, et al. (1991). *Biochim Biophys Acta.* 1095(2): 127-39.

Londos, C., D. M. Cooper, et al. (1981). *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14: 163-71.

Lu, H. S., J. J. Chai, et al. (2001). *J Biol Chem*. 276(37): 34913-7. Epub 2001 Jul 3.

Massague, J. and M. P. Czech (1982). *J Biol Chem*. 257(12): 6729-38.

Massague, J., P. F. Pilch, et al. (1980). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(12): 7137-41.

Massague, J., L. A. Blinderman, et al. (1982). *J Biol Chem*. 257(23): 13958-63.

Matsui, T., M. Heidarani, et al. (1989). *Science*. 243(4892): 800-4.

Matsui, T., J. H. Pierce, et al. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(21): 8314-8.

Medina, L. C., J. Vazquez-Prado, et al. (1998). *FEBS Lett*. 422(2): 141-5.

Medina, L., J. Vazquez-Prado, et al. (2000). *Biochem J*. 350 Pt 2: 413-9.

Meldrum, E., R. W. Kriz, et al. (1991). *Eur J Biochem*. 196(1): 159-65.

Meldrum, E., P. J. Parker, et al. (1991). *Biochim Biophys Acta*. 1092(1): 49-71.

Mills, I., J. A. Garcia-Sainz, et al. (1986). *Biochim Biophys Acta*. 876(3): 619-30.

Minneman, K. P. (1988). *Pharmacol Rev*. 40(2): 87-119.

Minneman, K. P., C. Han, et al. (1988). *Mol Pharmacol*. 33(5): 509-14.

Minneman, K. P., G. K. Mumford, et al. (1988). *J Pharmacol Exp Ther*. 244(1): 226.

Miyasaka, T., M. V. Chao, et al. (1990). *J Biol Chem*. 265(8): 4730-5.

Molina-Munoz, T., M. T. Romero-Avila, et al. (2006). *Mol Endocrinol*. 20(11): 2773.

Morgan, H. E., E. Cadenas, et al. (1961). *J Biol Chem*. 236: 262-8.

Moriarty, T. M., E. Padrell, et al. (1990). *Nature*. 343(6253): 79-82.

Morrow, A. L. and I. Creese (1986). *Mol Pharmacol*. 29(4): 321-30.

Mukherjee, C., M. G. Caron, et al. (1975). *J Biol Chem*. 250(13): 4869-76.

Mumby, M. C. and G. Walter (1993). *Physiol Rev*. 73(4): 673-99.

Musacchio, A., T. Gibson, et al. (1993). *Trends Biochem Sci*. 18(9): 343-8.

Nakayama, N., A. Miyajima, et al. (1985). *Embo J*. 4(10): 2643-2648.

Neer, E. J. and D. E. Clapham (1988). *Nature*. 333(6169): 129-34.

Neer, E. J., S. Y. Kim, et al. (1988). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 53(Pt 1): 241.

Nielsen, T. B., P. M. Lad, et al. (1980). *Biochim Biophys Acta*. 629(1): 143-55.

Nishizuka, Y. (1984). *Science*. 225(4668): 1365-70.

Nishizuka, Y., Y. Takai, et al. (1984). *Recent Prog Horm Res* 40: 301-45.

Northup, J. K., P. C. Sternweis, et al. (1980). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(11): 6516.

Oppermann, W., H. Wehner, et al. (1979). *Adv Exp Med Biol* 119: 295-300.

Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). *Science*. 289(5480): 739-45.

Pathak, B. G., D. J. Gilbert, et al. (1995). *Genomics*. 28(1): 116-8.

Pawson, T. (1993). *Dev Genet* 14(5): 333-8.

Pawson, T. (1995). *Nature*. 373(6515): 573-80.

Pawson, T., P. Olivier, et al. (1993). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 340(1293).

Perez, D. M., M. T. Piascik, et al. (1991). *Mol Pharmacol*. 40(6): 876-83.

Perez, D. M., M. B. DeYoung, et al. (1993). *Mol Pharmacol*. 44(4): 784-95.

Perez, D. M., M. T. Piascik, et al. (1994). *Mol Pharmacol*. 46(5): 823-31.

Pfaffinger, P. J., J. M. Martin, et al. (1985). *Nature*. 317(6037): 536-8.

Pfeuffer, T. and R. Thomas (1974). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 355(10): 1237-8.



Piascik, M. T., M. S. Smith, et al. (1994). *Mol Pharmacol*. 46(1): 30-40.

Pilch, P. F. and M. P. Czech (1979). *J Biol Chem*. 254(9): 3375-81.

Premont, R. T., J. Inglese, et al. (1995). *Faseb J*. 9(2): 175-82.

Prentki, M., T. J. Biden, et al. (1984). *Nature*. 309(5968): 562-4.

Prentki, M., D. Janjic, et al. (1984). *J Biol Chem*. 259(16): 10118-23.

Prentki, M., D. Janjic, et al. (1984). *J Biol Chem*. 259(22): 14054-8.

Prentki, M., C. B. Wollheim, et al. (1984). *J Biol Chem*. 259(22): 13777-82.

Pyne, N. J., C. Waters, et al. (2004). *Methods Enzymol* 390: 451-75.

Ray, L. B. and T. W. Sturgill (1987). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(6): 1502-6.

Reuveny, E., P. A. Slesinger, et al. (1994). *Nature*. 370(6485): 143-6.

Rhee, S. G. and K. D. Choi (1992). *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 26.

Robinson, D. R., Y. M. Wu, et al. (2000). *Oncogene*. 19(49): 5548-57.

Robles-Flores, M., E. Rendon-Huerta, et al. (1997). *Protein Expr Purif*. 10(1): 32-7.

Rodbell, M. (1975). *J Biol Chem*. 250(15): 5826-34.

Rodbell, M. (1980). *Nature*. 284(5751): 17-22.

Rodbell, M., L. Birnbaumer, et al. (1971). *Biochem J*. 125(3): 58P-59P.

Rodbell, M., M. C. Lin, et al. (1974). *Acta Endocrinol Suppl* 191: 11-37.

Rodbell, M., M. C. Lin, et al. (1975). *Adv Cyclic Nucleotide Res* 5: 3-29.

Rokosh, D. G., B. A. Bailey, et al. (1994). *Biochem Biophys Res Commun*. 200(3).

Ross, R., J. Glomset, et al. (1974). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71(4): 1207-10.

Roth, R. A., D. J. Cassell, et al. (1983). *Biochem Biophys Res Commun*. 115(1): 245.

Ruderman, N. B., R. Kapeller, et al. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(4): 1411-5.

Ruff-Jamison, S., J. McGlade, et al. (1993). *J Biol Chem*. 268(11): 7610-2.

Schlegel, W., E. S. Kempner, et al. (1979). *J Biol Chem*. 254(12): 5168-76.

Schmidt, C. J. and E. J. Neer (1991). *J Biol Chem*. 266(7): 4538-44.

Schwinn, D. A., S. Cotecchia, et al. (1990). *Trans Assoc Am Physicians* 103: 112-8.

Schwinn, D. A., J. W. Lomasney, et al. (1990). *J Biol Chem*. 265(14): 8183-9.

Schwinn, D. A., G. I. Johnston, et al. (1995). *J Pharmacol Exp Ther*. 272(1): 134-42.

Seino, S., M. Seino, et al. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(1): 114-8.

Shichi, H., R. L. Somers, et al. (1983). *Methods Enzymol* 99: 362-6.

Shih, T. Y., P. E. Stokes, et al. (1982). *J Biol Chem*. 257(19): 11767-73.

Shih, T. Y., M. O. Weeks, et al. (1982). *J Virol*. 42(1): 253-61.

Shimizu, N. (1986). *Nippon Rinsho*. 44(1): 194-201.

Shimizu, Y. and N. Shimizu (1986). *J Biol Chem*. 261(16): 7342-6.

Sibley, D. R. and R. J. Lefkowitz (1986). *Clin Neuropharmacol*. 9(Suppl 4): 3-5.

Sibley, D. R., P. Nambi, et al. (1984). *Biochem Biophys Res Commun*. 121(3): 973-9.

Sibley, D. R., J. R. Peters, et al. (1984). *J Biol Chem*. 259(15): 9742-9.

Simon, A. J., Y. Milner, et al. (1991). *Proc Biol Sci*. 243(1307): 165-71.

Simon, M. I., M. P. Strathmann, et al. (1991). *Science*. 252(5007): 802-8.

Simonds, W. F., J. E. Butrynski, et al. (1991). *J Biol Chem*. 266(9): 5363-6.

Stadel, J. M., P. Nambi, et al. (1983). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(11): 3173-7.

Stadel, J. M., B. Strulovici, et al. (1983). *J Biol Chem.* 258(5): 3032-8.

Starke, K., H. Montel, et al. (1971). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol* 271(2).

Stiles, G. L., R. H. Strasser, et al. (1984). *Biochim Biophys Acta.* 802(3): 390-8.

Strasser, R. H. and R. J. Lefkowitz (1985). *J Biol Chem.* 260(8): 4561-4.

Strasser, R. H., G. L. Stiles, et al. (1984). *Endocrinology.* 115(4): 1392-400.

Streb, H., R. F. Irvine, et al. (1983). *Nature.* 306(5938): 67-9.

Strulovici, B., R. A. Cerione, et al. (1984). *Science.* 225(4664): 837-40.

Su, Y. F., L. Cubeddu, et al. (1976). *J Cyclic Nucleotide Res.* 2(4): 257-70.

Takeda, S., S. Kadowaki, et al. (2002). *FEBS Lett.* 520(1-3): 97-101.

Tanimoto, T., A. O. Lungu, et al. (2004). *Circ Res.* 94(8): 1050-8. Epub 2004 Mar 25.

Ullrich, A., J. R. Bell, et al. (1985). *Nature.* 313(6005): 756-61.

Ushiro, H. and S. Cohen (1980). *J Biol Chem.* 255(18): 8363-5.

Van Obberghen, E., M. Kasuga, et al. (1983). *Reprod Nutr Dev.* 23(2(B)): 357-66.

Van Obberghen, E., B. Rossi, et al. (1983). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(4): 945-9.

Vazquez-Prado, J. and J. A. Garcia-Sainz (1996). *Mol Pharmacol.* 50(1): 17-22.

Vazquez-Prado, J., L. C. Medina, et al. (1997). *J Biol Chem.* 272(43): 27330-7.

Vazquez-Prado, J., P. Casas-Gonzalez, et al. (2003). *Cell Signal.* 15(6): 549-57.

Vogel, W. and A. Ullrich (1996). *Cell Growth Differ.* 7(12): 1589-97.

Waters, C. M., K. C. Oberg, et al. (1990). *Biochemistry.* 29(14): 3563-9.

Weinberg, D. H., P. Trivedi, et al. (1994). *Biochem Biophys Res Commun.* 201(3).

Weston, C. R., D. G. Lambright, et al. (2002). *Science.* 296(5577): 2345-7.

White, M. F., E. W. Stegmann, et al. (1987). *J Biol Chem.* 262(20): 9769-77.

Whitman, M., C. P. Downes, et al. (1988). *Nature.* 332(6165): 644-6.

Wilden, U., E. Wust, et al. (1986). *FEBS Lett.* 207(2): 292-5.

Wilks, A. F. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(5): 1603-7.

Yang, S. D., Y. L. Fong, et al. (1988). *J Biol Chem.* 263(18): 8856-8.

Yarden, Y., J. A. Escobedo, et al. (1986). *Nature.* 323(6085): 226-32.

Yarden, Y. and J. Schlessinger (1987). *Biochemistry.* 26(5): 1443-51.

Yarden, Y. and J. Schlessinger (1987). *Biochemistry.* 26(5): 1434-42.