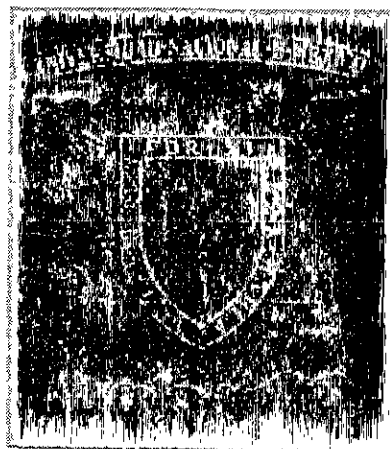


5058'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DEL RECEPTOR A  
BRADICININA HUMANO TIPO B2 EXPRESADO EN CELULAS DE  
INSECTO SF9.

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS  
BIOQUIMICA

Presenta:

M. en C. GUADALUPE REYES CRUZ.

México, D.F.

2000



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.

Esta tesis fue realizada en el instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Luis A. Vaca Domínguez. El proyecto fue apoyado por donativos de la DGAPA y del CONACyT (al Dr. Luis A. Vaca Domínguez) y del PADEP ( a la M. en C. Guadalupe Reyes Cruz). La autora recibió beca de la DGAPA para realizar sus estudios de Doctorado.

A José:

Porque su gran amor y su apoyo fueron  
fundamentales en todo momento.....

A mis padres:

Andrés y Carmen

Por todo el cariño y apoyo  
que siempre me han dado  
y por el orgullo de ser su hija

A mis hermanos:

Elizabeth, Claudia, Andrés y Dora Alicia.

Por ser los mejores amigos que he tenido.....

A mis sobrinas:

Nayely, Sheila y Araceli

Por darme tantos momentos de alegría.....

A mis abuelitos.

## Agradecimientos:

Ai Dr. Luis Vaca Domínguez. Por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio. Su entusiasmo siempre me impulsó a no declinar...

A los Dres. Alejandro Zentella Dehesa y Jorge Vázquez Ramos. Quienes junto con el Dr. Luis Vaca Domínguez formaron parte de mi comité tutorial. Agradezco su tiempo en la discusión de los resultados del presente trabajo. Sus críticas y comentarios sirvieron para enriquecer el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. J. Adolfo García Sáinz por permitirme realizar parte de este proyecto en su laboratorio, gracias a ello este trabajo es más completo. Así mismo por la revisión del manuscrito, sus comentarios fueron muy enriquecedores.

Al Dr. José Vázquez Prado por ayudarme en los experimentos de fosforilación, unión de GTPyS y del binding con bradiginina.

A la Dra. Amelia Farres y a Lety García Gutierrez por ayudarme en estos momentos tan difíciles para la UNAM, su disposición para apoyarme y para que todo fuera más sencillo, fueron un paso fundamental para la realización del examen de grado.

A los Dres. Adolfo García Sáinz, Alejandro Zentella Dehesa, Luis Covarrubias Robles, José Pedraza Chaverri, Ignacio Camacho Arroyo, Enrique Ortega Soto y Julio Morán Andrade por su revisión crítica de esta tesis, su comprensión y ayuda para presentar el examen fue indispensable.

A la DGAPA cuyo apoyo fue fundamental para la realización del Doctorado.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por su apoyo durante una parte de mis estudios de posgrado.

A mis compañeros del laboratorio 102-Oriente del Instituto de Fisiología Celular: Alicia Sampieri, Verónica Morales, Juan Ramón Martínez, Claudia Sánchez Cárdenas, Anaíd Antaramian, Marco A. Álvarez Pérez y Armando Butanda Ochoa.

A los compañeros del laboratorio 303-Sur y 304-Sur del Instituto de Fisiología Celular: Luz del Carmen Medina, Patricia Casas, Rocio Alcantara, Ma. Teresa Romero, Claudia González, Agustín García, Erendira Avendaño y Francisco Vázquez porque siempre tuvieron buena disposición y amabilidad para conmigo cuando estuve realizando parte de este trabajo en su laboratorio.

A la sra. Gloria Salgado Cortez por su trabajo en el laboratorio que permite facilitar el nuestro.

A los chicos de la biblioteca y computo: María Elena, Raúl, Javier, Juan Barbosa e Ibetín por su disposición y amabilidad en ayudarme siempre.

INDICE.	página
I. Resumen.....	3
II Abstract.....	5
1. Introducción.....	7
II. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G.....	9
a) Características generales.....	9
b) Clasificación y diversidad de los receptores acoplados a proteínas G.....	9
c) Estructura de los receptores acoplados a proteínas G.....	10
d) Unión de Ligando.....	13
III. MECANISMOS DE ACTIVACION DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A G.....	13
IV. PROTEINAS G.....	15
a) Subunidades $\alpha$ de la proteína G.....	18
b) El dímero $\beta\gamma$ de la proteína G.....	18
c) Selectividad en la interacción entre el receptor y la proteína G.....	19
d) Acoplamiento de los receptores a múltiples proteínas G.....	19
V. RECAMBIO DE FOSFOINOSITIDOS CALCIO.....	21
a) Fosfolipasa C.....	23
b) Liberación y ondas de calcio.....	24
c) Proteína cinasa C.....	27
VI. DESENSIBILIZACION.....	29
a) Fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G.....	30
b) Papel de las GRKs en la regulación de los receptores acoplados a proteínas G: <i>el modelo del receptor <math>\beta_2</math>-adrenérgico</i> .....	31
c) Las arrestinas.....	34
d) Desensibilización heteróloga y papel de las proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros.....	35
e) Internalización de los receptores acoplados a proteínas G.....	36
f) Disminución del número de receptores.....	38
VII. DOMINIOS PROTEICOS QUE COORDINAN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES.....	39

a) Dominios SH2.....	39
b) Dominios SH3.....	41
c) Dominios PH.....	42
VIII. CINASAS CON ESPECIFICIDAD POR RESIDUOS DE TIROSINA.....	44
a) Receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina.....	45
b) Cinasas citosólicas de residuos de Tirosina.....	47
IX. COMUNICACION ENTRE LAS VIAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES.....	50
X. FORMACION DE LA BRADICININA.....	53
a) Calcicreínas.....	56
b) Cininógenos.....	56
XI. RECEPTORES PARA BRADICININA.....	57
XII. JUSTIFICACION.....	65
XIII. OBJETIVOS.....	65
a) Objetivos particulares.....	65
XIV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	66
XV. RESULTADOS.....	68
a) Expresión funcional y caracterización farmacológica.....	68
b) Desensibilización del receptor para bradiginina.....	69
c) Papel de las cinasas sensibles a genisteína.....	70
d) Ubicación de los receptores para bradiginina en la membrana.....	71
e) La genisteína incrementa la fosforilación del receptor B2.....	71
XVI. MANUSCRITO "Regulation of the Human Bradykinin B2 Receptor Expressed in sf21 Insect Cells: A possible Role for Tyrosine Kinases".....	72
a) Abstract.....	73
b) Material and methods.....	77
c) Results.....	83
d) Discussion.....	89
e) References.....	95
f) Figure legends.....	102
XVII. DISCUSION.....	116
XVIII. CONCLUSIONES.....	124
XIX. REFERENCIAS.....	125

## 1) RESUMEN:

Los receptores para bradicinina han sido agrupados de acuerdo a su afinidad por varias cininas, los tipos más conocidos son el B1 y el B2. Los receptores para bradicinina del tipo B2, motivo del presente estudio, se acoplan a la cascada de recambio de fosfoinosítidos calcio, a través de una proteína insensible a toxina pertussis que activa a la fosfolipasa C $\beta$ . La bradicinina, el agonista natural de estos receptores, promueve la liberación de calcio de reservorios intracelulares y el influjo de este ion, proveniente del espacio extracelular. En el presente trabajo, se expresó el receptor para bradicinina tipo B2 humano de forma funcional en células si21 por infección con baculovirus recombinantes. En este modelo celular se estudió la regulación de los receptores B2, quedando demostrada una desensibilización homóloga dependiente de una cinasa(s) con especificidad por residuos de tirosina, sensibles a genisteina.

Los receptores B2 recombinantes, detectados con un anticuerpo dirigido contra su carboxilo terminal en una preparación membranal separada electroforéticamente y transferida a nitrocelulosa, tuvieron un peso molecular de 75 a 80 kDa. La distribución celular de los receptores B2 se determinó por microscopía confocal, un anticuerpo dirigido contra un péptido de la segunda asa extracelular demostró la presencia de los receptores en la membrana plasmática de las células si21. La abundancia de los receptores B2 en preparaciones membranales y su afinidad por [ $^3$ H]-bradicinina se determinó mediante análisis de unión de este ligando radiactivo, demostrándose una unión saturable y específica con una Kd de 0.66 nM; se detectaron 2.57 pmol de receptores por miligramo de proteína, a las 54 h postinfección. La activación de los receptores B2 indujo un incremento en la concentración intracelular de calcio ([Ca $^{2+}$ ]), en células infectadas con el virus recombinante, y promovió la unión de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S a una preparación de membranas derivadas de estas células. La magnitud de la respuesta fue dependiente de la concentración de bradicinina (con una EC $_{50}$  de 50 nM para la movilización de calcio) y se inhibió por N- $\alpha$ -adamantaneacetil-D-Arg $^9$ -[Hyp $^3$ ,Thi $^{5,8}$ -D-Phe $^7$ ]-Bk, un antagonista específico para receptores B2. El antagonista, aplicado en el punto máximo de la respuesta intracelular, fue capaz de acelerar el retorno del calcio intracelular hacia niveles basales, sugiriendo que



en este punto la movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  es aún dependiente de la ocupación del receptor. Un agonista específico para los receptores B1 (Des-Arg<sup>9</sup>-Bk) no indujo respuesta en estas células ni afectó la actividad de la bradicinina sobre los receptores B2. La bradicinina no activó la movilización de calcio en células no infectadas o infectadas con el virus silvestre, demostrando la ausencia de receptores B2 endógenos en las células si21. Inhibidores de la actividad de cinasas de residuos de tirosina (genisteína y tirfostina A51) incrementaron la actividad, dependiente de la presencia de bradicinina, de los receptores B2, sin influenciar los niveles basales de  $[Ca^{2+}]_i$ . Los receptores B2 sufrieron desensibilización homóloga como resultado de aplicaciones repetidas de bradicinina. Es interesante notar que la genisteína previno, en cierto grado, esta desensibilización homóloga. La genisteína no afectó la transducción de receptores endógenos para octopamina (también acoplados a recambio de fosfoinosítidos-calcio) ni la movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  detectada al inhibir con taspigargina a la ATPasa del retículo endoplásmico responsable del retorno de este ion a los reservorios intracelulares. Así pues, el efecto del inhibidor de cinasas de tirosina fue específico sobre la transducción de los receptores B2.

En el período de tiempo en el que la genisteína tuvo los efectos antes mencionados, el número de receptores, detectados en la superficie celular por microscopía confocal, permaneció constante. La bradicinina promovió un incremento en la fosforilación basal del receptor B2 que fue acentuado por el tratamiento con genisteína. El análisis de fosfoaminoácidos reveló la presencia de fosfoserina y trazas de fosfotreonina, pero no se detectó fosfotirosina. Estos datos sugieren que la existencia de una o varias cinasa de tirosina, cuya actividad responde a la presencia de bradicinina y son inhibidas por la genisteína, que pudieran estar actuando a un nivel previo a la fosforilación del receptor. Es interesante notar que la genisteína previno el desacoplamiento, dependiente del agonista, de los receptores B2 y las proteína G, de acuerdo a estudios de unión de  $[^{35}S]GTP\gamma S$  en membranas de células pretratadas con bradicinina. Nuestros resultados sugieren que la actividad de los receptores para bradicinina B2 humanos es modulada negativamente por una o varias cinasas con especificidad por residuos de tirosina.

## II) ABSTRACT

Bradykinin receptors, members of the super-family of G-protein coupled receptors, structurally characterized by their seven transmembrane spanning helices, are coupled to the inositol phosphate cascade via an PTX-insensitive G protein and phospholipase C in a wide variety of tissues. Currently, bradykinin receptors are classified in type 1 and 2. Bradykinin, acting on type 2 receptors, stimulates the release of calcium from intracellular storage compartments and the subsequent influx of calcium from the extracellular space.

The functional regulation of the human bradykinin B2 receptor overexpressed in sf21 cells was studied. Human bradykinin B2 receptors were detected by Western analysis as a band of 75-80 kDa present in membranes from recombinant baculovirus-infected cells and localized at the plasma membrane, by confocal microscopy, using an antibody against an epitope from its second extracellular loop. B2 receptors, detected in membrane preparations by [<sup>3</sup>H-Bradykinin] binding, showed a K<sub>d</sub> of 0.66 nM and an expression level of 2.57 pmol/mg of protein at 54 h postinfection. In these cells, bradykinin induced a transient increase of intracellular calcium ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in fura 2-AM loaded sf21 cells, and promoted [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S binding to membranes. The effects of bradykinin were dose-dependent (with an EC<sub>50</sub> of 50 nM for calcium mobilization) and were inhibited by N- $\alpha$ -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5,8</sup>,D-phe<sup>7</sup>]-Bk, a specific B2 receptor antagonist. Applications of the B2 antagonist at the top of the calcium transient accelerated the decline of the peak, suggesting that calcium mobilization at this point was still influenced by receptor occupation. No [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization was elicited with 1  $\mu$ M (Des-Arg<sup>9</sup>)-Bk, a B1 receptor agonist that did not inhibit the subsequent action of 100 nM bradykinin. No effect of bradykinin was detected in uninfected cells or cells infected with the wild type baculovirus. Bradykinin-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization was increased with genistein and tyrphostin A51. These tyrosine kinase inhibitors did not modify basal levels of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Homologous desensitization of the B2 receptor was observed after repeated applications of bradykinin, which resulted in attenuated changes in intracellular calcium. Besides, genistein promoted an increased response to a third exposure to the agonist when

applied after washing the cells that had been previously challenged with two increasing doses of bradykinin. Genistein did not affect the  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization induced by activation of the endogenous octopamine G protein-coupled receptor or by thapsigargin. The B2 receptor, detected by confocal microscopy in unpermeabilized cells, remained constant at the surface of cells stimulated with bradykinin for 10 min, in the presence or absence of genistein. Agonist-promoted phosphorylation of the B2 receptor was markedly accentuated by genistein treatment. Phosphoaminoacid analysis revealed the presence of phosphoserine and traces of phosphothreonine, but not phosphotyrosine, suggesting that the putative tyrosine kinase(s), activated by bradykinin, could act in a step previous to receptor phosphorylation. Interestingly, genistein prevented agonist-induced G protein uncoupling from B2 receptors, determined by *in vitro* bradykinin-stimulated  $[^{35}S]$ -GTP $_{\gamma}S$  binding, in membranes from bradykinin pretreated cells. Our results suggests that tyrosine kinase(s) regulate the activity of the human B2 receptor in sf21 cells by affecting its coupling to G proteins and its phosphorylation.

## 1. INTRODUCCION

La comunicación intercelular es indispensable para mantener la homeostasis en los organismos vivos. Esta comunicación, que coordina eventos tales como el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo de una gran variedad de células en diversos tejidos y organismos, puede ser por contacto directo célula a célula o bien a distancia. En el caso anterior, productos extracelulares, hormonas y neurotransmisores actúan como señales. Estas sustancias son sintetizadas y liberadas por células, generalmente de origen endócrino o neuronal, especializadas en coordinar la función de diversos tejidos donde residen las células que tienen receptores para los mensajeros intercelulares. La comunicación celular puede ser de tipo endócrino, parácrino o autócrino, dependiendo del sitio de origen y destino de la molécula mensajera [Alberts, 1994]. En general, la señal endócrina depende de la actividad de células glandulares que liberan hormonas, transportadas en el torrente sanguíneo, hasta alcanzar a su célula blanco. En la señal parácrina, la célula blanco está en contacto estrecho con la célula generadora de la señal y la comunicación solamente ocurre con el grupo de células blanco adyacentes, como ejemplo de esta vía se encuentran los neurotransmisores que propagan los impulsos neuronales o de una célula neuronal a una muscular. En la comunicación autócrina, las células responden a sustancias que son liberadas por ellas mismas, ejemplo de esta vía se da en las células en cultivo donde muchas veces responden a factores de crecimiento que ellas producen. En ocasiones, la misma sustancia puede actuar en dos o más de estos tipos de vías de comunicación; ciertos péptidos funcionan como neurotransmisores (señal parácrina) y como hormonas sistémicas (señal endócrina) [Alberts, 1994,].

La evolución de los organismos multicelulares ha sido dependiente de la capacidad desarrollada por las células para comunicarse entre ellas y con su medio ambiente. Las células poseen la habilidad para procesar e integrar una gran cantidad de información transmitida a través de señales extracelulares de origen y características diversas, tales como hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento; o bien señales sensoriales como la luz, los olores y los

sabores. Estas señales no atraviesan la membrana plasmática, su acción está mediada por la activación de receptores específicos, situados en la superficie celular, mismos que constan de un dominio extracelular especializado en el reconocimiento y unión del mensajero y dominios intracelulares dedicados directa o indirectamente a promover la generación de mensajeros intracelulares (conocidos como segundos mensajeros). Desde luego, cabe mencionar que existe un amplio grupo de hormonas tipo esteroides que actúan sobre receptores intracelulares, mismos que pueden funcionar como factores de transcripción, este grupo no va a ser tratado aquí. El dominio intracelular de los receptores de membrana puede tener actividad catalítica, particularmente de cinasa, como el caso de los receptores para factores de crecimiento. Por otro lado, en algunos receptores el dominio transmembranal tiene función efectora (el poro, en el caso de algunos receptores tipo canal) [Iismaa *et al*, 1995; Yang *et al*, 1995]. En principio, la transducción de señales es caracterizada por un sistema rígido que acopla a un receptor con un efector. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el receptor de membrana representa el primer elemento de tres o más componentes en el sistema de transducción de señales, donde los diversos elementos interactúan secuencial y reversiblemente.

En el caso de los receptores acoplados a proteínas G, de los que nos ocuparemos en este estudio, un agonista se une a un receptor específico resultando en la activación de proteínas heterotriméricas intracelulares que unen nucleótidos de guanina (proteínas G), mismas que actúan como transductores y amplificadores de la señal. Las proteínas G modulan la actividad de efectores tales como enzimas, canales iónicos y transportadores, resultando en una alteración rápida en la concentración de segundos mensajeros (por ejemplo AMPc, fosfatos de inositol, diacil glicerol, ácido araquidónico y algunos iones citosólicos, particularmente el calcio) [Gudermann *et al*, 1997].

## II. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G.

### a) Características generales:

Miembros de la familia de los receptores acoplados a proteínas G han sido identificados en organismos evolutivamente tan distantes como las levaduras [Dohlman *et al*, 1991], las plantas [Plakidou-Dymock *et al*, 1998], los hongos [Devreotes *et al*, 1994], así como los protozoarios y metazoarios [Vernier, *et al*, 1995; New and Wong, 1998]. En vertebrados, esta gran familia de receptores contiene entre 1000 y 2000 miembros, incluyendo a los receptores para olores que exceden a los 1000. Hoy en día, varios cientos de ellos han sido clonados [Gudermann *et al*, 1995, 1997]. Una comparación de la estructura primaria de los receptores acoplados a proteínas G indica que estas proteínas tienen un patrón estructural común. Estos receptores constan de siete dominios transmembranales, compuestos de aminoácidos hidrofóbicos, que forman una hélice  $\alpha$ , conectados entre sí por 3 asas extracelulares y por 3 asas intracelulares [Baldwin, 1994; Strader *et al*, 1994]. El extremo amino terminal se localiza en la parte extracelular y el carboxilo terminal se extiende hacia el citoplasma. La comparación de la secuencia de aminoácidos de los receptores clonados muestra que los segmentos transmembranales constituyen las regiones con mayor grado de identidad, misma que se pierde en los extremos amino y carboxilo terminales y en las asas extra e intracelulares. La construcción y expresión funcional de receptores quiméricos y de receptores con un solo cambio en algún aminoácido en los segmentos transmembranales, o en residuos altamente conservados en los receptores, ha llevado a la identificación de residuos importantes para la unión del ligando [Dohlman *et al*, 1991; Strader *et al*, 1994; Wess, 1995].

### b) Clasificación y diversidad de los receptores acoplados a proteínas G:

Esta gran familia de receptores ha sido dividida en 5 subfamilias de acuerdo a la homología y a las características del sitio de unión del ligando. La familia 1 contiene a la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, incluyendo a los receptores para olores. Tres subgrupos conforman a esta familia, al grupo 1a pertenecen los receptores para rodopsina y los receptores  $\beta$ -

adrenérgicos, que se han convertido en paradigmas en el campo de estudio de la transducción de señales generada por receptores acoplados a proteínas G. En este grupo de receptores, el sitio de unión para el ligando se encuentra dentro de los 7 dominios transmembranales. El grupo 1b comprende a los receptores para péptidos (formyl Met-Leu-Phe, fMLP), citocinas y trombina, cuyo sitio de unión incluye el amino terminal, las asas extracelulares y la parte superior de los segmentos transmembranales del receptor. El grupo 1c está formado por los receptores para hormonas glicoproteicas (LH, TSH, FSH), sus miembros se caracterizan por un amino terminal largo, su sitio de unión al ligando, encontrado en el amino terminal, no involucra a los dominios transmembranales pero tiene contactos en las asas extracelulares 1 y 2. La familia 2, para ligandos de alto peso molecular tales como el glucagón y la secretina, tiene una estructura similar al grupo 1c, pero no existe homología en la secuencia de estos receptores. La familia 3 está compuesta por los receptores para glutamato (metabotrópicos) y los receptores que se activan por calcio extracelular. Los receptores GABA-B y un grupo de receptores para feromonas acoplados a proteínas  $G_o$ , han sido recientemente incluidos en esta familia. Estas 3 familias de receptores acoplados a proteínas G se identifican fácilmente al comparar su secuencia de aminoácidos. La familia 4 comprende a los receptores para feromonas acoplados a la proteína  $G_i$ . La familia 5 incluye a los receptores Smo (por *smoothened*) y los receptores frizzled, involucrados en el desarrollo embrionario y en particular en la polaridad y la división celular. Finalmente, en una familia aparte se ha ubicado a un grupo de receptores para AMPc que solamente se han identificado en el hongo *Dictiostellium discoideum* [Bockaert y Pin, 1999].

Para los fines de esta tesis, de aquí en adelante nos referiremos exclusivamente a ejemplos de receptores acoplados a proteínas G del grupo a y b de la familia 1, entre los que se encuentra el receptor para bradicinina B2 humano, cuya regulación es el motivo de estudio de este trabajo.

### c) Estructura de los receptores acoplados a proteínas G:

A pesar de la gran variedad de receptores acoplados a proteínas G conocidos, todos ellos comparten homología estructural. Como se mencionó

anteriormente, ellos exhiben una estructura de serpentín con 7 dominios hidrofóbicos que forman  $\alpha$  hélices transmembranales (TM I-TM VII), conectados por 3 asas extracelulares (E1-E3) y por 3 asas intracelulares (I1-I3) [Baldwin 1993]. Un residuo de cisteína, conservado en el carboxilo terminal de muchos receptores acoplados a proteínas G, sirve como un sitio potencial de palmitoilación; esta modificación provoca que parte del carboxilo se ancle a la membrana y forme una cuarta asa intracelular (I4) (figura 1a). Las siete  $\alpha$  hélices transmembranales se distribuyen en sentido contrario a las manecillas del reloj formando una estructura relativamente compacta con una cavidad central (Figura 1b). Los receptores acoplados a proteínas G están N-glicosilados en el amino terminal, esta modificación es necesaria para que los receptores se exporten del Golgi a la membrana plasmática. Un puente disulfuro, presente en muchos receptores acoplados a proteínas G, formado por una cisteína en el asa E2 y una cisteína que se encuentra en la unión del TM III y el asa E1, se considera importante para el empaquetamiento y para la estabilidad de los siete segmentos transmembranales. Muchos de los receptores acoplados a proteínas G tienen residuos de serina y treonina en el asa I3 y en el carboxilo terminal, mismos que son sustrato para cinasas, conocidas como GRKs, específicas para este grupo de receptores e involucradas en los procesos de desensibilización (ver más adelante).



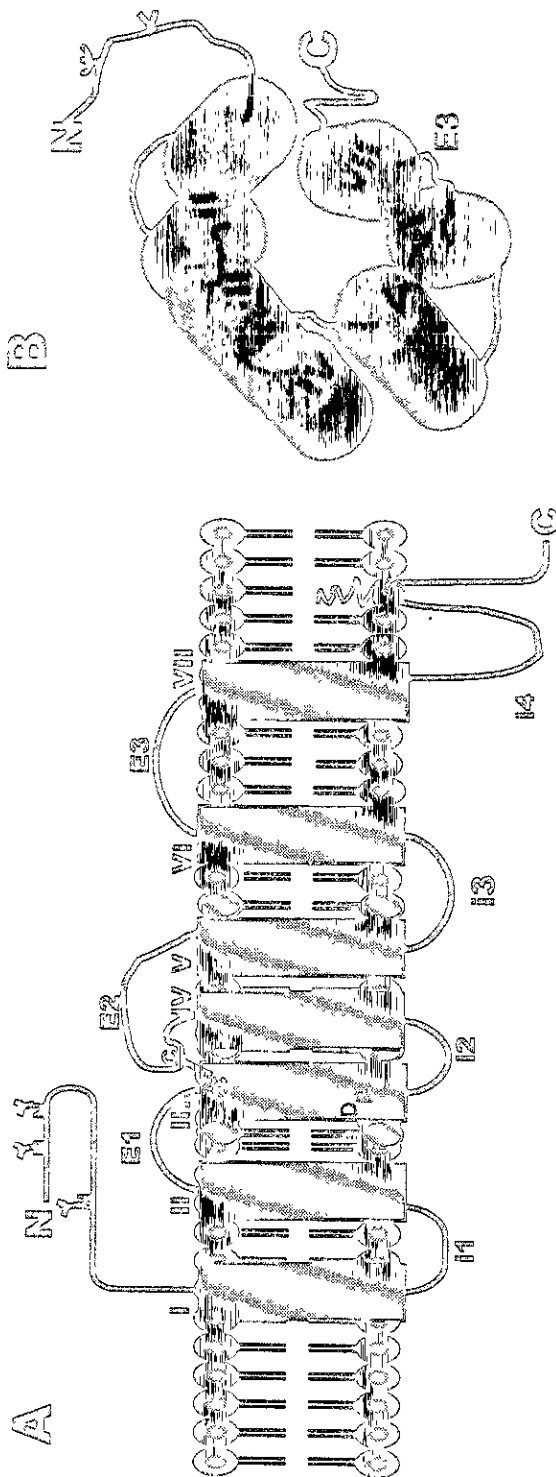


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de los receptores acoplados a proteínas G. A) Los siete dominios transmembranales (I a VII) están conectados por las asas extracelulares (E1, E2 y E3) e intracelulares (i1, i2 e i3). El amino terminal se sitúa en la porción extracelular y contiene sitios de N-glicosilación (N). El carboxilo terminal se sitúa en la porción intracelular y contiene una cisteína conservada (C) que puede ser palmitoilada para formar la cuarta asa intracelular (i4). Un enlace disulfuro conecta a las asas E1 y E2 y al segmento III (c-c). B) diagrama tridimensional (vista superior) donde se demuestra que los siete dominios transmembranales se distribuyen en la membrana en sentido contrario a las manecillas del reloj.

#### d) Unión del ligando:

Muchos experimentos se han encaminado a localizar, en los receptores, los sitios responsables de la unión del ligando. Los resultados más contundentes derivan de experimentos con receptores modificados por mutación puntual. Los sitios que muestran participación en la unión del ligando generalmente están constituidos por residuos capaces de formar puentes de hidrógeno, residuos cargados en los segmentos transmembranales, así como residuos altamente conservados en los receptores. En los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos y en los receptores para acetilcolina muscarínicos, el sitio de unión para su ligando está formado por una cavidad ubicada en el centro de los siete segmentos transmembranales. Dicha cavidad, en forma de nido, se inserta hasta la mitad de la membrana celular. Los grupos amino de los agonistas se asocian a un ácido aspártico ubicado en el tercer segmento transmembranal, mientras que otras regiones del ligando interactúan con residuos específicos de los segmentos transmembranales V y VI [Ji *et al*, 1998].

### III. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G:

Bien podría suponerse que las características de activación de los distintos receptores acoplados a proteínas G fueran comunes. Sin embargo, como se ha visto con la unión del ligando, también existen variaciones importantes en el mecanismo de activación. La activación de los receptores para rodopsina involucra cambios en la conformación de la proteína que incluyen expansión lateral en la membrana y exposición de residuos en la parte citoplásmica. Por otro lado, el hecho de que la solubilización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos causa un incremento en su afinidad por el agonista, ha sugerido que la conformación inactiva de otros receptores acoplados a proteínas G puede estar forzada por el medio que los rodea [Shenker, 1995].

Puesto que los siete dominios transmembranales de los receptores acoplados a proteínas G constituyen su cuerpo principal, un cambio en la conformación de estos dominios es probablemente responsable de la activación

#### d) Unión del ligando:

Muchos experimentos se han encaminado a localizar, en los receptores, los sitios responsables de la unión del ligando. Los resultados más contundentes derivan de experimentos con receptores modificados por mutación puntual. Los sitios que muestran participación en la unión del ligando generalmente están constituidos por residuos capaces de formar puentes de hidrógeno, residuos cargados en los segmentos transmembranales, así como residuos altamente conservados en los receptores. En los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos y en los receptores para acetilcolina muscarínicos, el sitio de unión para su ligando está formado por una cavidad ubicada en el centro de los siete segmentos transmembranales. Dicha cavidad, en forma de nido, se inserta hasta la mitad de la membrana celular. Los grupos amino de los agonistas se asocian a un ácido aspártico ubicado en el tercer segmento transmembranal, mientras que otras regiones del ligando interactúan con residuos específicos de los segmentos transmembranales V y VI [Ji *et al*, 1998].

### III. MECANISMOS DE ACTIVACION DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G:

Bien podría suponerse que las características de activación de los distintos receptores acoplados a proteínas G fueran comunes. Sin embargo, como se ha visto con la unión del ligando, también existen variaciones importantes en el mecanismo de activación. La activación de los receptores para rodopsina involucra cambios en la conformación de la proteína que incluyen expansión lateral en la membrana y exposición de residuos en la parte citoplásmica. Por otro lado, el hecho de que la solubilización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos causa un incremento en su afinidad por el agonista, ha sugerido que la conformación inactiva de otros receptores acoplados a proteínas G puede estar forzada por el medio que los rodea [Shenker, 1995].

Puesto que los siete dominios transmembranales de los receptores acoplados a proteínas G constituyen su cuerpo principal, un cambio en la conformación de estos dominios es probablemente responsable de la activación

de estos receptores. Por ejemplo, la mutagenesis dirigida en aminoácidos conservados, ubicados en estos dominios, tales como aspártico y glutámico en los segmentos II-14 y III-24 y arginina y prolina en los segmentos III-25 y VII-8, ha revelado que estos aminoácidos son importantes en el proceso de activación de los receptores [Shenker, 1995]. Se ha visto que cambios en la orientación de los segmentos III y VI se asocian con la conformación activa e inactiva de los receptores, aparentemente estos movimientos promueven el ocultamiento o exposición intracelular del sitio de unión de las proteínas G [Farrens *et al*, 1996; Bourne *et al*, 1997; Javitch *et al*, 1997]. El tripéptido DRY, en el dominio transmembranal III, y un aspártico en el dominio transmembranal II, también son importantes para la activación de los receptores [Oliviera *et al*, 1994; Scheer *et al*, 1996].

Así mismo, los cambios en la conformación de los segmentos transmembranales generalmente afectan la conformación de las asas intracelulares 2 y 3, mismas que constituyen parte de los sitios clave para el acoplamiento de las proteínas G y para la activación de los receptores [Spengler *et al*, 1993; Pin y Bockaert, 1995; Wess, 1997]. Las asas intracelulares 2, 3 y 4 (esta última que se forma transitoriamente por palmitoilación del dominio carboxilo terminal) poseen sitios de contacto con las proteínas G y son cruciales para la transmisión de las señales producidas por la unión del agonista [Hedin *et al*, 1994; Blüml *et al*, 1994]. El grupo de Lefkowitz [Kjelsberg *et al*, 1992], descubrió que la substitución de una alanina, localizada en la unión de la asa intracelular 3 y el segmento transmembranal VI en los receptores  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos, por cualquier otro aminoácido, causa un incremento en la afinidad por el agonista, así como la activación de las proteínas G en ausencia del ligando (este es un ejemplo de activación constitutiva). Una modificación equivalente también produce activación constitutiva de los receptores  $\beta_2$  y  $\alpha_2$ -adrenérgicos [Samama *et al*, 1993; Ren *et al*, 1993], de los receptores para tirotrópina [Kosugi *et al*, 1993, 1994] y de los receptores de levadura para feromonas [Boone, 1993].

Se cree que la conformación inactiva de los receptores permite

“esconder” secuencias de aminoácidos, en la cara citoplásmica, impidiendo la activación de las proteínas G [Shenker, 1995]. Dicho de otra forma, la unión del agonista al receptor conduce a una conformación activa de éste que expone secuencias citoplásmicas capaces de activar a las proteínas G [Gudermann *et al*, 1997]. Este modelo asume que un receptor desocupado adopta ocasionalmente, de forma espontánea, la conformación activa produciendo una actividad basal muy baja. La capacidad de activación espontánea “basal” es variable. Por ejemplo, los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos [Kjelsberg *et al*, 1992] y los receptores para leutropina [Shenker, 1993] son aparentemente “inactivos” en ausencia del agonista, mientras que los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos [Samama *et al*, 1993] y los receptores para tiotropina no lo son [Kosugi *et al*, 1993].

La unión del ligando a los receptores promueve la activación de una proteína G heterotrimérica, que reside en el lado intracelular de la membrana. La activación de la proteína G inicia la respuesta conocida como señal intracelular. Algunas proteínas G regulan la concentración de segundos mensajeros, particularmente el adenosin monofosfato cíclico (AMPC) o el calcio. La liberación del calcio de depósitos intracelulares es inducida por el inositol trifosfato, producto de la actividad de una fosfolipasa específica para el fosfatidilinositol(4,5)bifosfato, regulada por una proteína G. Otras proteínas G controlan directamente la función de algunos canales iónicos en la membrana plasmática. A continuación serán descritas las características de los elementos intracelulares partícipes de la transducción de señales generadas por los receptores acoplados a proteínas G.

#### IV. PROTEINAS G:

Las proteínas G heterotriméricas están compuestas de 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Actualmente se conocen cuatro grupos clasificados con base en la homología de la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  [Hamm y Glichrist 1996; Nürnberg *et al*, 1995]. Esta subunidad  $\alpha$  comparte además homología con miembros de una gran familia de GTPasas que incluyen a las proteínas G de bajo peso molecular como Rho y Ras, además de muchos factores involucrados

“esconder” secuencias de aminoácidos, en la cara citoplásmica, impidiendo la activación de las proteínas G [Shenker, 1995]. Dicho de otra forma, la unión del agonista al receptor conduce a una conformación activa de éste que expone secuencias citoplásmicas capaces de activar a las proteínas G [Gudermann *et al*, 1997]. Este modelo asume que un receptor desocupado adopta ocasionalmente, de forma espontánea, la conformación activa produciendo una actividad basal muy baja. La capacidad de activación espontánea “basal” es variable. Por ejemplo, los receptores  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos [Kjelsberg *et al*, 1992] y los receptores para leutropina [Shenker, 1993] son aparentemente “inactivos” en ausencia del agonista, mientras que los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos [Samama *et al*, 1993] y los receptores para tirotrópina no lo son [Kosugi *et al*, 1993].

La unión del ligando a los receptores promueve la activación de una proteína G heterotrimérica, que reside en el lado intracelular de la membrana. La activación de la proteína G inicia la respuesta conocida como señal intracelular. Algunas proteínas G regulan la concentración de segundos mensajeros, particularmente el adenosin monofosfato cíclico (AMPC) o el calcio. La liberación del calcio de depósitos intracelulares es inducida por el inositol trifosfato, producto de la actividad de una fosfolipasa específica para el fosfatidilinositol(4,5)bifosfato, regulada por una proteína G. Otras proteínas G controlan directamente la función de algunos canales iónicos en la membrana plasmática. A continuación serán descritas las características de los elementos intracelulares partícipes de la transducción de señales generadas por los receptores acoplados a proteínas G.

#### IV. PROTEINAS G:

Las proteínas G heterotriméricas están compuestas de 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Actualmente se conocen cuatro grupos clasificados con base en la homología de la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  [Hamm y Gilchrist 1996; Nürnberg *et al*, 1995]. Esta subunidad  $\alpha$  comparte además homología con miembros de una gran familia de GTPasas que incluyen a las proteínas G de bajo peso molecular como Rho y Ras, además de muchos factores involucrados

en la síntesis de proteínas.

El ciclo de activación-inactivación de las proteínas G es crucial para la transmisión de la señal del receptor al efector [Neer, 1995]. La subunidad  $\alpha$ , cuando tiene GDP unido, permanece asociada con el dímero  $\beta\gamma$ , formando un heterotrímero inactivo, acoplado al receptor. Cabe destacar que en este estado, de receptor acoplado a proteína G heterotrimérica, la afinidad de éste por su ligando es mayor que en el estado desacoplado [Hamm, 1998; Vaughan, 1998]. El cambio conformacional sufrido por un receptor activo modifica la afinidad de la subunidad  $\alpha$  por el GDP. En esta situación, el GDP es reemplazado por GTP, la subunidad  $\alpha$  asume su conformación activa y se disocia del receptor y del dímero  $\beta\gamma$  [Birbaumer y Birbaumer, 1995]. El estado activo de la subunidad  $\alpha$  permanece hasta que ésta hidroliza al GTP, quedando "cargada" con GDP. La velocidad de hidrólisis del GTP varía sustancialmente de un subtipo de subunidades  $\alpha$  a otro [Carty, 1990; Linder, 1990]. Una vez que el GTP es hidrolizado a GDP, la subunidad  $\alpha$  se reasocia con el dímero  $\beta\gamma$  y se une nuevamente al receptor, quedando el sistema listo para responder a otro estímulo (Figura 2). De tal manera que la hidrólisis del GTP es a su vez un mecanismo que controla la duración de la activación de las subunidades  $\alpha$  y del dímero  $\beta\gamma$ . Recientemente se ha descrito un grupo de proteínas reguladoras de la actividad de GTPasa de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas. La importancia de este grupo, conocido como proteínas RGS, radica en que acelera la velocidad intrínseca de GTPasa y acorta la vida media del estado activo de la subunidad  $\alpha$ , modulando el ciclo de las proteínas G en forma independiente del receptor [Ross, 1995].

La subunidad  $\alpha$  y el dímero  $\beta\gamma$  disociados modulan la actividad de sistemas efectores específicos: como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa  $C\beta$ , la fosfodiesterasa y ciertos canales para calcio y potasio [Birbaumer, 1992; Clapham y Neer, 1993; Neer, 1995]. La actividad de estas enzimas efectoras y de los canales iónicos regula la concentración celular de los segundos mensajeros responsables de desencadenar respuestas celulares.

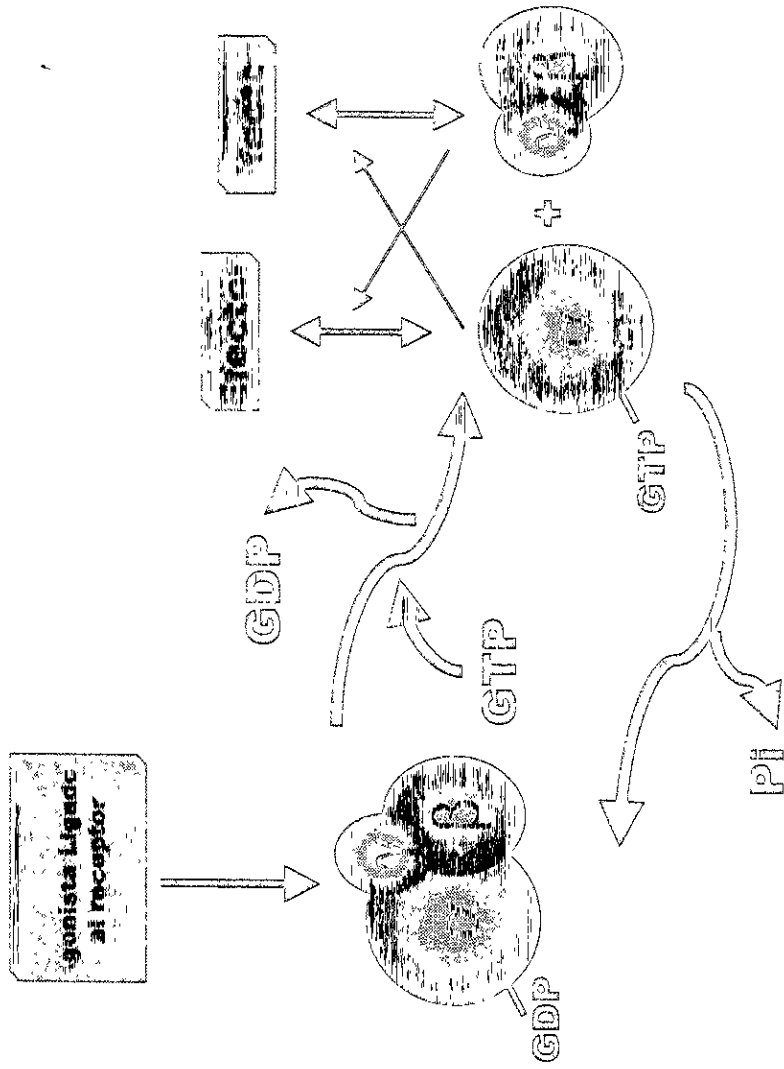


Figura 2. Ciclo de activación y desactivación de las proteínas G heterotrimericas. En su estado basal, la proteína G es un heterotrimerico con GDP unido fuertemente a la subunidad  $\alpha$ . El receptor activado cataliza el intercambio del GDP unido a la subunidad  $\alpha$  por el GTP. La subunidad  $\alpha$  con el GTP unido se disocia del dímero  $\beta\gamma$ , ambas subunidades activadas pueden actuar sobre sus efectores. La actividad de GTPasa de la subunidad  $\alpha$  hidroliza al GTP, retornando a esta subunidad a la forma inactiva, esto facilita la reasociación del heterotrimerico.



### a) Subunidades $\alpha$ de la proteína G:

Hoy en día se conocen 23 subunidades  $\alpha$  diferentes que se han dividido en 4 familias:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{12}$ . Las subunidades  $\alpha$ , codificadas por 17 genes diferentes [Simon *et al*, 1991; Kehienbach *et al*, 1995; Nürnberg *et al*, 1995], son proteínas con un peso molecular que va de 39 a 52 kDa y comparten entre 45 y 85 % de homología en su secuencia de aminoácidos. Algunos tipos de subunidades  $G\alpha$ , particularmente  $G\alpha_i$ , se miristoilan en una glicina cercana al amino terminal. La asociación a la membrana de la subunidad  $G\alpha$  depende de modificaciones postraduccionales tales como miristoilación y palmitoilación, así como de su asociación con el dímero  $\beta\gamma$ , cuya subunidad  $\gamma$  tiene incorporado un grupo isoprenilo insertado en la membrana. La miristoilación es una modificación irreversible, en tanto que la palmitoilación es reversible. Algunas subunidades  $G\alpha$  pueden sufrir una o ambas modificaciones, este hecho ha llevado a postular que la incorporación de estos grupos regula el grado de asociación a la membrana y por ende la actividad de las proteínas G, particularmente de la subunidad  $G\alpha$  [Milligan *et al*, 1995]. Las subunidades  $\alpha$  están compuestas de dos dominios principales: el dominio de GTPasa que incluye al sitio de unión de nucleótidos de guanina, el sitio de unión al receptor y el sitio de unión del dímero  $\beta\gamma$  y un dominio de  $\alpha$  hélice que puede contribuir, junto con el dominio de GTPasa, a la unión de los efectores.

### b) El dímero $\beta\gamma$ de la proteína G:

El dímero  $\beta\gamma$  es un complejo proteico que debido a la asociación estrecha entre cada una de sus subunidades se considera como una unidad funcional. Sus componentes pueden disociarse solamente bajo condiciones desnaturalizantes *in vitro*. Se han descrito 5 diferentes tipos de subunidades  $\beta$  y 11 de subunidades  $\gamma$ . Los diferentes tipos de subunidades  $\beta$  se caracterizan por tener un grado alto de homología en su secuencia de aminoácidos (del 53 al 90 %). El peso molecular de las subunidades  $\beta$  es aproximadamente de 36 kDa. En contraste, las subunidades  $\gamma$  se consideran más diversas entre ellas, comparten

solamente un 25% de homología [Neer, 1995; Ray *et al*, 1995; Morishita *et al*, 1995]. Las subunidades  $\gamma$ , que tienen un peso de 6-9 kDa, sufren modificaciones postraduccionales tales como isoprenilación y metilación en el carboxilo terminal. Estas modificaciones permiten la interacción adecuada del dímero  $\beta\gamma$  con la membrana plasmática y con la subunidad  $\alpha$ , a su vez facilitan que la señal se transmita a sus respectivos efectores.

c) Selectividad en la interacción entre el receptor y la proteína G:

La activación de una proteína G puede llevar a la bifurcación de señales. Las subunidades  $\alpha$  por su parte, transmiten la señal a una proteína efectora, mientras que el dímero  $\beta\gamma$  puede propagar parte de esta información al activar a un efector distinto [Hamm y Gilchrist, 1996; Clapham y Neer, 1993]. Entre las proteínas efectoras que pueden ser activadas por el dímero  $\beta\gamma$ , independientemente de la subunidad  $\alpha$ , se encuentran las cinasas específicas para los receptores acoplados a proteínas G (GRK 2 y GRK 3, cuya función se describe en la sección de desensibilización) que se unen a la membrana celular a través del dímero  $\beta\gamma$ . Así mismo, la vía de activación de la cinasa activada por mitógenos (MAPK) puede derivar de la función de heterodímeros  $\beta\gamma$  libres [Lohse, 1993]. Adicionalmente, el dímero  $\beta\gamma$  puede llevar a la activación de determinadas isoformas de fosfolipasa C $\beta$  [Camps *et al*, 1992; Smrcka y Sternweiss, 1993] de adenilato ciclasa [Chen *et al*, 1995], de fosfolipasa A2 [Kim *et al*, 1989], de fosfatidilinositol 3-cinasa [Morris *et al*, 1995; Zhang *et al*, 1994], y de varias cinasas de residuos de tirosina como la Tsk, la Btk y la Pyk2 [Tsukada *et al*, 1995; Langhans-Rajasenkaran *et al*, 1995; Lev *et al*, 1995].

d) Acoplamiento de los receptores a múltiples proteínas G:

La expresión de una variedad de subunidades de proteínas G, y la asociación posible entre las distintas variedades, podría teóricamente dar como resultado la formación de cientos de heterotrímeros diferentes. Sin embargo, hay evidencias que demuestran que existe especificidad en el ensamble del dímero  $\beta\gamma$  y que no todas las combinaciones posibles son formadas [Pronin y Gautam,

1992; Schmidt *et al*, 1992; Garritsen y Simmonds, 1994].

Los receptores de siete dominios transmembranales pueden acoplarse con más de una proteína G, dando como resultado una transducción de señales multifuncional. Así pues, los receptores acoplados a proteínas G no siempre llevan a un solo efecto directo sobre una vía de transducción de señales, generalmente la transducción lleva a la amplificación de la señal inicial. Por ejemplo, los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y los muscarínicos  $M_2$  se acoplan a varias proteínas G de la familia  $G_{1/o}$  [Offermanns y Schultz, 1994]. En muchas células, la activación de este tipo de receptores puede, a su vez, inhibir a la adenilato ciclasa (vía  $G_{\alpha_i}$  y/o  $\beta\gamma$ ), activar corrientes de  $K^+$  (vía el dímero  $\beta\gamma$  derivado de  $G_{1/o}$ ) e inhibir canales de calcio (vía  $G_o$ ).

Varios receptores acoplados a  $G_{1/o}$  son capaces de ejercer una transducción de señales dual; por ejemplo, los receptores muscarínicos  $m_2$  y  $m_4$ , los receptores para dopamina D2, para serotonina entre otros inhiben a la adenilato ciclasa y estimulan a la fosfolipasa C- $\beta$  [Gudermann *et al*, 1996]. Se piensa que en este caso las subunidades  $\alpha$  median la inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que el dímero  $\beta\gamma$ , liberado de  $G_i$ , activa a la fosfolipasa C. Algunos receptores acoplados a  $G_s$  (por ejemplo los receptores para TSH, LH-CG y FSH, receptores para dopamina D1 entre otros) estimulan a la fosfolipasa C $\beta$  y a la adenilato ciclasa [Gudermann *et al*, 1996], esto puede interpretarse como acoplamiento de dos diferentes proteínas G ( $G_s$  y  $G_{q/11}$ ) o en términos de la activación de  $G_{\alpha_s}$  que modula positivamente la actividad de la adenilato ciclasa, y de la presencia del dímero  $\beta\gamma$ , liberado de  $G_s$ , capaz de activar a ciertas isoformas de la fosfolipasa C $\beta$  [Birnbaumer, 1992]. En miocitos cardiacos transfectados y en células de insecto si9 se ha observado que los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, comúnmente acoplados a  $G_s$ , pueden acoplarse a proteínas G sensibles a toxina pertussis (pertenecientes a la familia  $G_i$ ) [Xiao *et al*, 1995; Gudermann y Schultz].

Otros patrones de acoplamiento que se han descrito incluyen al de los receptores muscarínicos ( $M_1$  y  $M_3$ ) y al de los receptores para adenosina  $A_2$ , capaces de interactuar con proteínas  $G_q$  y  $G_i$ . Así mismo, los receptores  $\alpha_{1B}$ -

adrenérgicos, que normalmente se acoplan a  $G_q$ , pueden también activar a la proteína  $G_s$  [Offermanns *et al*, 1994; Palmer *et al*, 1995; Horie *et al*, 1995].

#### V. RECAMBIO DE FOSFOINOSITIDOS CALCIO:

La estimulación de los receptores acoplados a proteínas G, como ya se mencionó, causa la disociación de las subunidades de las proteínas G seguido de el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$ . Esto puede resultar en la activación de distintas isoformas de adenilato ciclasa, fosfolipasa  $C\beta$  y otras fosfolipasas sensibles a  $G\alpha$  y a  $G\beta\gamma$ . La fosfolipasa  $C\beta$  actúa sobre el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, a partir del cual se genera inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacil glicerol. En este paso, la señal se divide en dos vías, el  $IP_3$  difunde rápidamente en el citosol y se une a sus receptores que se encuentran en el retículo endoplásmico, mismos que forman un canal que permite la movilización de calcio de reservorios intracelulares. El diacil glicerol activa a miembros de la familia de la proteína cinasa C (PKC), algunos de los cuales ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) también requieren del calcio liberado (Figura 3) [Alberts, 1994; Berridge, 1993].

El diacil glicerol ejerce papeles diferentes en la transducción de señales: por un lado, puede ser sustrato para la producción de ácido araquidónico, puede actuar como segundo mensajero o bien utilizarse en la síntesis de eicosanoides. Por otro lado, el papel más importante del diacil glicerol consiste en activar a la PKC, esta cinasa fosforila residuos de serina y treonina, modificando la actividad de diversas proteínas en la célula [Alberts, 1994; Clapham, 1995].

adrenérgicos, que normalmente se acoplan a  $G_q$ , pueden también activar a la proteína  $G_s$  [Offermanns *et al*, 1994; Palmer *et al*, 1995; Horie *et al*, 1995].

#### V. RECAMBIO DE FOSFOINOSITIDOS CALCIO:

La estimulación de los receptores acoplados a proteínas G, como ya se mencionó, causa la disociación de las subunidades de las proteínas G seguido de el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$ . Esto puede resultar en la activación de distintas isoformas de adenilato ciclasa, fosfolipasa  $C\beta$  y otras fosfolipasas sensibles a  $G\alpha$  y a  $G\beta\gamma$ . La fosfolipasa  $C\beta$  actúa sobre el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, a partir del cual se genera inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacil glicerol. En este paso, la señal se divide en dos vías, el  $IP_3$  difunde rápidamente en el citosol y se une a sus receptores que se encuentran en el retículo endoplásmico, mismos que forman un canal que permite la movilización de calcio de reservorios intracelulares. El diacil glicerol activa a miembros de la familia de la proteína cinasa C (PKC), algunos de los cuales ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) también requieren del calcio liberado (Figura 3) [Alberts, 1994; Berridge, 1993].

El diacil glicerol ejerce papeles diferentes en la transducción de señales: por un lado, puede ser sustrato para la producción de ácido araquidónico, puede actuar como segundo mensajero o bien utilizarse en la síntesis de eicosanoides. Por otro lado, el papel más importante del diacil glicerol consiste en activar a la PKC, esta cinasa fosforila residuos de serina y treonina, modificando la actividad de diversas proteínas en la célula [Alberts, 1994; Clapham, 1995].

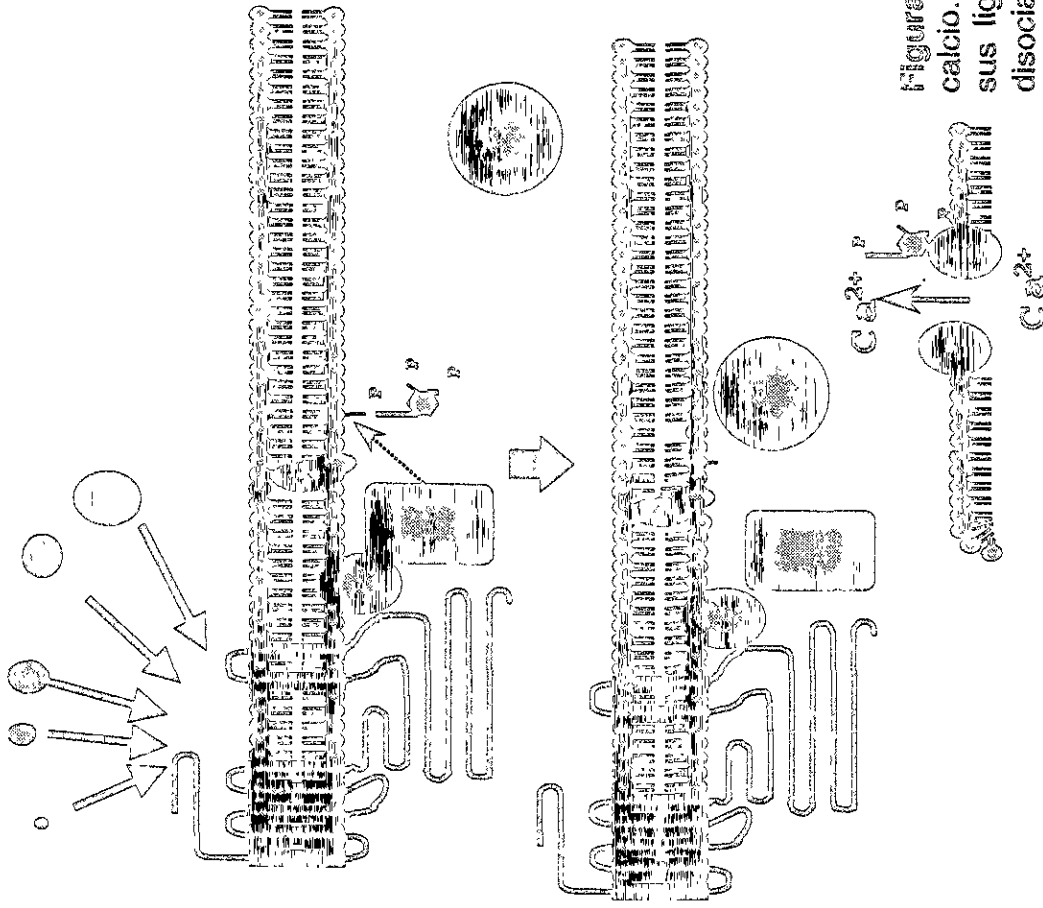


Figura 3. Diagrama del sistema de recambio de fosfoinosítidos calcio. Los receptores acoplados a proteínas  $G_q$ , activados por sus ligandos, sufren un cambio conformacional que lleva a la disociación de la proteína  $G$  en la subunidad  $\alpha$ , la subunidad  $\alpha_q$  que activa a la fosfolipasa  $C\beta$  y el dímero  $\beta\gamma$  que puede actuar sobre diversos efectores, como algunas isoformas de fosfolipasa  $C\beta$ . La fosfolipasa  $C\beta$  hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato para producir  $IP_3$  y diacil glicerol. El  $IP_3$  se une a sus receptores en el retículo endoplásmico provocando la liberación de calcio, este ión activa a isoformas de PKC convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$  y  $\gamma$ ). Por otro lado el diacil glicerol activa a las isoformas de PKC no convencionales ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  y  $\theta$ ).

### a) Fosfolipasa C:

Existen tres familias de fosfolipasas tipo C (la  $\beta$ , la  $\gamma$  y la  $\delta$ ). Todas ellas están formadas por una sola cadena polipéptica. Cada familia de fosfolipasa C está conformada por varios subtipos, incrementando así la diversidad de mecanismos activadores y reguladores para esta vía de transducción. De la isoenzima  $\beta$  se conocen 4 tipos, 2 de la  $\gamma$  y 4 de la  $\delta$ . La isoenzima del tipo  $\gamma$  es más pequeña (85 kDa) que las isoformas  $\beta$  y  $\delta$  (140-150 kDa) [Rhee y Choi, 1992; Noh *et al*, 1995; Lee y Rhee, 1995]. El dominio catalítico de los tres tipos es altamente homólogo (40-60%) y se divide en dos regiones designadas como X y Y. En los tipos  $\beta$  y  $\delta$  esta región está separada por una secuencia corta de 50 a 70 aminoácidos, mientras que en el tipo  $\gamma$  se encuentra separada por una larga secuencia (de 400 aminoácidos) que contiene dos dominios SH2 y un dominio SH3. Los tres tipos de isoenzimas tienen un dominio de homología con pleckstrina (conocido como PH), localizado en el amino terminal, la isoforma  $\gamma$  tiene dos dominios PH que flanquean a los dominios SH. Los dominios PH median la interacción de la fosfolipasa con la membrana a través del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato. Todas las isoenzimas requieren de calcio para su actividad [Noh *et al*, 1995; Lee *et al*, 1995; Smith *et al*, 1994].

El mecanismo de activación de la fosfolipasa C depende de la isoforma de la que se trate. De esta manera, la fosfolipasa C  $\beta$  es activada por los receptores de 7 dominios transmembranales a través de la subunidad  $G\alpha_{q/11}$ . La activación de la fosfolipasa C  $\gamma$  está dada por la fosforilación de receptores para factores de crecimiento, promovida por la unión de su ligando, así como segundos mensajeros que la activan directamente (como el ácido fosfatídico y el ácido araquidónico). Por su parte, la fosfolipasa C  $\delta$ , cuyo mecanismo de activación es el menos conocido, se cree que responde a receptores acoplados a la familia de proteínas  $G_n$ . La fosfolipasa C  $\delta$  también se activa por la proteína que activa a la GTPasa para la pequeña proteína G Rho [Feng *et al*, 1996; Homma y Emori, 1995].

Dentro de los receptores que activan a la fosfolipasa C  $\beta$ , a través de la

subunidad  $\alpha$ , se encuentran: los receptores para tromboxano  $A_2$ , para bradicinina, para bombesina, para angiotensina II, para endotelina, los muscarínicos  $m_1$  y  $m_3$ , los  $\alpha_1$ -adrenérgicos y los receptores para la hormona estimulante de la tiroides [Noh *et al*, 1995; Kuang *et al*, 1996].

Entre los receptores que activan a la fosfolipasa  $C\beta$ , a través del dímero  $\beta\gamma$ , se encuentran los receptores para hormona luteinizante, para vasopresina, los  $\beta_1$  y los  $\beta_2$ -adrenérgicos, los muscarínicos  $m_2$  y los receptores para interleucina 8 [Zhu y Birnbaumer, 1996]. La fosfolipasa  $C\beta$  es activada, tanto por las subunidad  $\alpha_q$  como por el dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G en respuesta a los receptores para vasopresina  $V_2$ , para hormona luteinizante, y los receptores para acetilcolina muscarínicos  $m_2$ . [Noh *et al*, 1995; Kuang *et al*, 1996].

El palmitato de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G afecta su asociación con la fosfolipasa  $C\beta$ . La fosfolipasa  $C\beta$  que responde a la subunidad  $\alpha$  y al dímero  $\beta\gamma$ , lo hace a través de sitios distintos de interacción. La subunidad  $\alpha$  se une a regiones del carboxilo terminal de la fosfolipasa  $C\beta$ , mientras que el sitio de unión con el dímero  $\beta\gamma$  se sitúa en una región que va del Glu<sup>435</sup> a la Val<sup>641</sup> [Kuang *et al*, 1996].

#### b) Liberación y ondas de calcio:

En una amplia variedad de tipos celulares, el calcio citosólico ( $[Ca^{2+}]_i$ ) juega un papel esencial como segundo mensajero. Este ión no puede metabolizarse, así que las células regulan los niveles de calcio a través de numerosas proteínas que lo capturan y/o lo transportan [Taylor y Broad, 1998].

En la vía de recambio de fosfolinosfidos-calcio, el  $IP_3$ , derivado de la digestión del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, actúa como un mensajero intracelular (Figura3). Los receptores para  $IP_3$ , de una composición tetramérica, se sitúan en la membrana del retículo endoplásmico, su activación resulta en la liberación del calcio almacenado en este organelo, a través del poro iónico de estos receptores. Esta señal, mediada por el  $IP_3$ , puede incrementar la concentración del calcio intracelular de 100 nM hasta 1  $\mu$ M [Berridge, 1993]. En la mayoría de



las células, la liberación rápida de calcio de sus depósitos intracelulares, que en segundos es regresado al retículo o transportado fuera de la célula, es seguida por una respuesta más sostenida, dependiente de la presencia de calcio extracelular y atribuida al influjo de calcio a través de la membrana [Putney y Bird, 1993; Takemura *et al*, 1989; Montero *et al*, 1991]. A esta entrada de calcio a la célula, debida a la depleción del calcio de reservorios intracelulares, se le conoce como entrada capacitativa. Esta corriente entrante de calcio fue designada como corriente de calcio activada por liberación intracelular de calcio (ICRAC) [Holtz y Penner, 1992,1993]. La entrada de calcio, o su liberación de reservorios intracelulares, modifica la actividad celular a través de proteínas dependientes de este ión.

La liberación de calcio, a través de los receptores para  $IP_3$ , produce breves pulsos de calcio que se dispersan (lo que se conoce como "hot spots" ó puntos calientes) alrededor de la entrada del canal, antes de difundirse a todo el citoplasma. La liberación local de calcio genera concentraciones elevadas de este ión en el espacio circundante al receptor que contribuyen a inhibirlo. La liberación local de calcio puede iniciar una respuesta mayor y global, como las llamadas ondas y oscilaciones de calcio [Berridge *et al*, 1999]. En las ondas de calcio, este ión liberado del retículo endoplásmico difunde a sitios adyacentes, donde incrementa la sensibilidad de los receptores vecinos para  $IP_3$  (hasta llegar a determinadas concentraciones arriba de las cuales su acción es inhibitoria), induciendo así más liberación de calcio, lo que se le ha llamado, liberación de calcio inducida por calcio. Las ondas de calcio son aceleradas dramáticamente a través del mecanismo de entrada capacitativa (Figura 4). Por otro lado, ciertas proteínas del retículo, conocidas como bombas de calcio (ATPasas), se encargan de recapturar el calcio citoplásmico bombeándolo hacia el interior del retículo. Diversas evidencias experimentales han permitido sugerir que los gradientes de calcio formados dentro de las células inician procesos como migración celular, exocitosis y liberación de neurotransmisores, entre otras funciones [Clapham, 1995; Berridge, 1999].

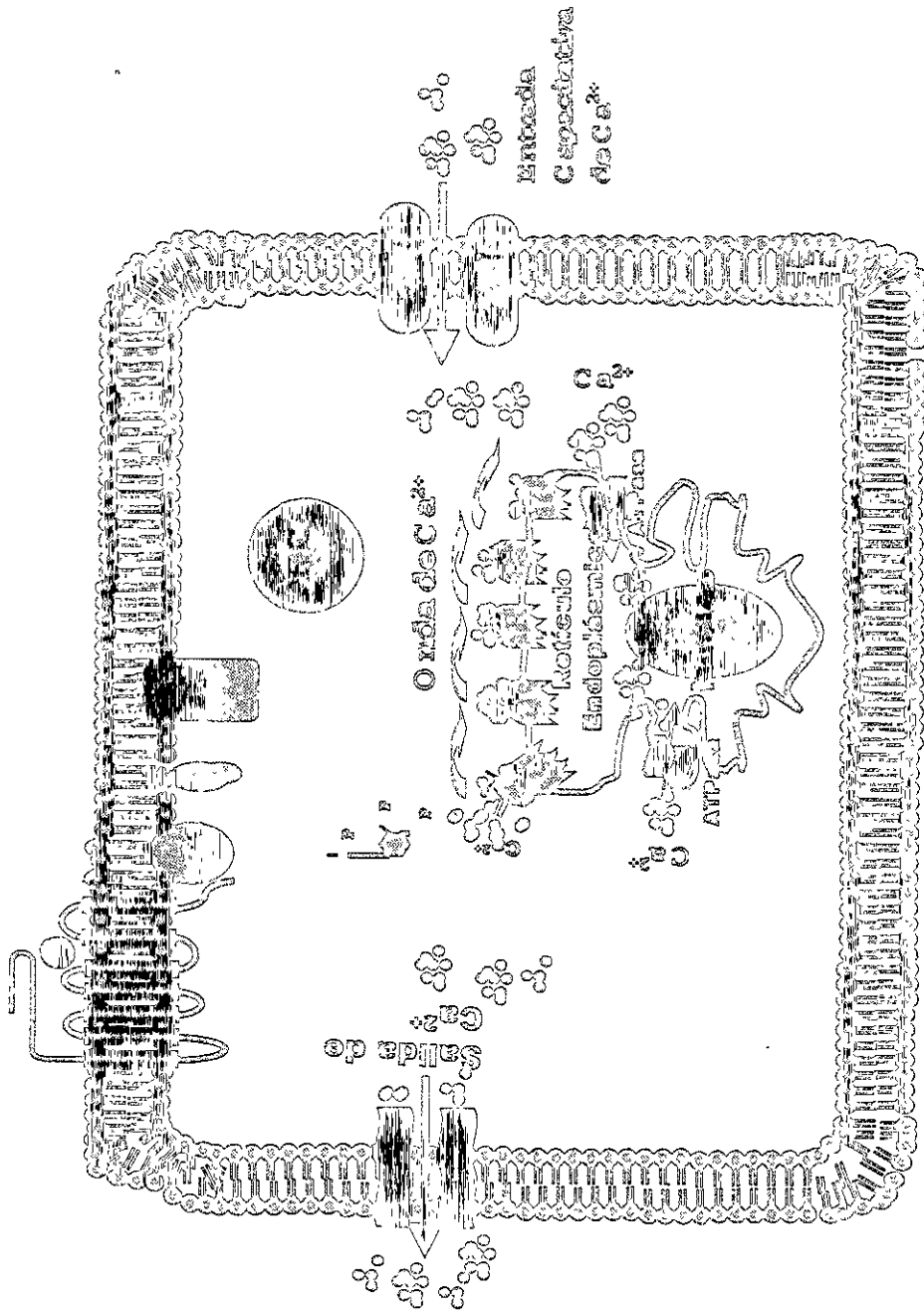


Figura 4. Mecanismos de la movilización intracelular de calcio. La liberación de calcio de reservorios intracelulares, promovida por el IP<sub>3</sub>, resulta en un aumento en la afinidad por el IP<sub>3</sub> de otros receptores vecinos, generando así más liberación de calcio. esta onda de calcio se expande por toda la célula para generar una respuesta sostenida. por otro lado, mecanismos que intervienen en la homeostasis de calcio permiten que este ion retorne al interior del retículo y también que salga de la célula.

### c) Proteína cinasa C (PKC):

La familia de la PKC ha sido clasificada en tres grupos, de acuerdo a su estructura y a su dependencia de co-factores: a) Las isoformas de PKC convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ), activadas por calcio, diacil glicerol y fosfatidil serina, b) Las isoformas de PKC no convencionales ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  y  $\theta$ ) activadas por diacil glicerol, fosfatidil serina y ácidos grasos no saturados, y no requieren calcio para activarse. Estos dos grupos pueden ser activados por ésteres de forbol (TPA) en sustitución del diacil glicerol. Por último c) El grupo de isoformas de PKC atípicas ( $\zeta$ ,  $\lambda$  y  $\iota$ ) que aparentemente responden a fosfatidil inosito 3,4,5-trifosfato, producto de la actividad de la cinasa que fosforila en posición 3 al fosfatidil inositol (PI3K), de la cual ciertas isoformas responden a la presencia del hetero dímero  $\beta\gamma$  libre [López-Illasaca *et al*, 1997]. Además pueden activarse por fosfatidil serina, fosfatidil inosítidos o por ácidos grasos no saturados [Nishizuka, 1992, 1993; Hung y Sarre, 1993].

La estructura molecular de todas las isoenzimas de familia de la PKC es similar. Todas ellas consisten de una sola cadena polipeptídica con una región reguladora en el amino terminal (de 20 a 70 kDa) y un dominio de cinasa en el carboxilo terminal (de aproximadamente 45 kDa). El dominio regulador dispone de regiones conservadas donde se une el diacil glicerol y los ésteres de forbol. Las isoformas de la PKC convencionales tienen además una región de unión para fosfatidil serina y calcio. En el dominio catalítico existe una secuencia que une ATP, misma que se comparte con otro tipo de cinasas, así como un sitio de unión del sustrato y la región de transferencia de fosfatos [Newton, 1997; Liu y Heckman, 1998].

Para que la PKC fosforile proteínas blanco es indispensable que primero se active. La activación de la PKC ocurre en tres etapas. El primer paso consiste en la fosforilación de la enzima en residuos de serina y treonina, esta fosforilación facilita que el sitio activo sea accesible y se estabilice en una forma activa. La PKC $\delta$  requiere para activarse de la fosforilación en residuos de tirosina. Posteriormente, la enzima se moviliza particularmente hacia la membrana plasmática, donde el diacil glicerol provoca un cambio conformacional

de la proteína, esto facilita la unión de fosfatidil serina y la liberación parcial del pseudosustrato (región de la enzima que en su estado inactivo bloquea al sitio de unión del sustrato). Finalmente, se estabiliza la unión de la PKC con la membrana y se remueve completamente el pseudosustrato, llegando la PKC a su activación máxima. Debido a que las isoformas convencionales de PKC dependen de calcio, cada vez que se movilice este ión de reservorios intracelulares, se unirá a la PKC que se encuentra en la membrana. El diacilglicerol, producto de la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, debido a la activación de los receptores membranales, desaparece rápidamente. Por otra parte, la hidrólisis de fosfatidil colina puede generar diacilglicerol, esta vía es más persistente y resulta de la acción de factores de crecimiento o citocinas, pudiendo ser sostenida por varias horas [Liu y Heckman, 1998]. El diacilglicerol producido por ambas vías es capaz de activar a la PKC, pero se procesa de manera diferente. El diacilglicerol, producido por la hidrólisis de fosfatidil inositol bisfosfato, es convertido rápidamente en ácido fosfatídico por una cinasa del diacilglicerol, para dar lugar, finalmente, a fosfatidil inositol. A su vez el diacilglicerol, proveniente de fosfatidil colina, es un sustrato pobre para la cinasa del diacilglicerol, de tal manera que se degrada lentamente por una lipasa [Zeisel, 1993; Florin-Christensen *et al*, 1992].

Por otro lado, la liberación de ácido araquidónico, promovida por varios ligandos, entre ellos la bradicinina, participa en numerosas funciones celulares. La fosfolipasa A<sub>2</sub> se activa cuando se incrementa la concentración intracelular de calcio, aumentando la concentración del ácido araquidónico intracelular [Khan *et al*, 1995]. Los ácidos grasos no saturados, como el ácido araquidónico, junto con el diacilglicerol y la fosfatidil colina sinergizan la activación de la PKC. De esta manera, la afinidad de la PKC por el calcio se incrementa cuando el diacilglicerol y el ácido araquidónico se encuentran presentes [Shinomura *et al*, 1991]. Así pues, eventos diferentes pueden activar selectivamente a las distintas isoenzimas de la PKC a través de la generación de diversos mensajeros intracelulares. Para el caso de las PKC atípicas, que se activan por fosfatidil serina y poco se conoce aun de los mecanismos que regulan su actividad.

Recientemente, se ha descrito que el fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato puede activar a la PKC $\zeta$  [Liu y Heckman, 1998].

#### VI. DESENSIBILIZACION:

Una vez que la transducción de señales se ha iniciado, también necesita terminarse, para asegurar la regulación precisa del funcionamiento celular. Múltiples mecanismos intracelulares contribuyen a la terminación de la señal generada por los receptores acoplados a proteínas G. Algunos eventos involucran la regulación a nivel de los receptores, mientras que otros ocurren a niveles posteriores de la cascada de transducción de las señales. El proceso de terminación de la señal es conocido como desensibilización. Este proceso se define como la atenuación o terminación de la señal a pesar de que el estímulo se aplique en forma de pulsos repetidos o que se encuentre presente continuamente [Ferguson *et al*, 1996]. La desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G ocurre inicialmente por la fosforilación de los receptores. En este proceso participan tres familias de proteínas reguladoras: las cinasas cuyos sustratos son específicamente miembros de esta familia de receptores (conocidas como GRKs por sus siglas en inglés: "G-protein-coupled-receptor kinases", ejemplos de ellas son la  $\beta$ ARK y la cinasa de la rodopsina), las cinasas reguladas por segundos mensajeros (PKA y PKC), y las arrestinas (las visuales y no visuales).

La desensibilización puede clasificarse en *desensibilización homóloga* y *desensibilización heteróloga*. La desensibilización homóloga depende estrictamente del agonista, de tal manera que solo los receptores activados se desensibilizan, generalmente como resultado de su fosforilación por GRKs. En contraste, la desensibilización heteróloga resulta de la activación de otros receptores no relacionados e incluso con sistemas de transducción de señales diferentes. En este caso participan fundamentalmente las cinasas activadas por segundos mensajeros (PKC y PKA). Así pues, este tipo de desensibilización ocurre en ausencia de la ocupación del receptor por su agonista [Hausdorff *et al*, 1990; Freedman y Lefkowitz, 1996; Bünemann *et al*, 1999].

Recientemente, se ha descrito que el fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato puede activar a la PKC $\zeta$  [Liu y Heckman, 1998].

## VI. DESENSIBILIZACION:

Una vez que la transducción de señales se ha iniciado, también necesita terminarse, para asegurar la regulación precisa del funcionamiento celular. Múltiples mecanismos intracelulares contribuyen a la terminación de la señal generada por los receptores acoplados a proteínas G. Algunos eventos involucran la regulación a nivel de los receptores, mientras que otros ocurren a niveles posteriores de la cascada de transducción de las señales. El proceso de terminación de la señal es conocido como desensibilización. Este proceso se define como la atenuación o terminación de la señal a pesar de que el estímulo se aplique en forma de pulsos repetidos o que se encuentre presente continuamente [Ferguson *et al*, 1996]. La desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G ocurre inicialmente por la fosforilación de los receptores. En este proceso participan tres familias de proteínas reguladoras: las cinasas cuyos sustratos son específicamente miembros de esta familia de receptores (conocidas como GRKs por sus siglas en inglés: "G-protein-coupled-receptor kinases", ejemplos de ellas son la  $\beta$ ARK y la cinasa de la rodopsina), las cinasas reguladas por segundos mensajeros (PKA y PKC), y las arrestinas (las visuales y no visuales).

La desensibilización puede clasificarse en *desensibilización homóloga* y *desensibilización heteróloga*. La desensibilización homóloga depende estrictamente del agonista, de tal manera que solo los receptores activados se desensibilizan, generalmente como resultado de su fosforilación por GRKs. En contraste, la desensibilización heteróloga resulta de la activación de otros receptores no relacionados e incluso con sistemas de transducción de señales diferentes. En este caso participan fundamentalmente las cinasas activadas por segundos mensajeros (PKC y PKA). Así pues, este tipo de desensibilización ocurre en ausencia de la ocupación del receptor por su agonista [Hausdorff *et al*, 1990; Freedman y Lefkowitz, 1996; Bünemann *et al*, 1999].

### Implicaciones de la desensibilización:

#### a) Fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G:

En la desensibilización homóloga los receptores acoplados a proteínas G son fosforilados por cinasas que principalmente reconocen a miembros de este grupo de receptores. Estas enzimas, conocidas como GRKs, fosforilan residuos de serina y treonina, mostrando una afinidad exquisita por los receptores activados. Usualmente los receptores no activados no son fosforilados por las GRKs. Se han identificado 6 tipos de GRKs: GRK1 (cinasa de la rodopsina), GRK2 y GRK3 (referidas como cinasas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos,  $\beta$ -ARK1 y  $\beta$ -ARK2), GRK4, GRK5 y GRK6 [Stoffel *et al*, 1994; Pitcher *et al*, 1998]. Las GRK1 y GRK4 muestran una distribución restringida a la retina y al testículo, respectivamente, las otras GRK están ampliamente distribuidas.

Estas enzimas son reguladas por factores múltiples, la GRK1 está isoprenilada [Inglese *et al*, 1992], mientras que las GRK4 y GRK6 están palmitoiladas. La palmitoilación, al ser un proceso reversible, es considerada un factor más en la dinámica que regula la asociación de estas cinasas a la membrana celular. La GRK5 está regulada por un mecanismo de autofosforilación que es estimulado por fosfolípidos [Kunapuli *et al*, 1994]. La GRK2 y la GRK3 requieren de fosfolípidos para activarse; un dominio PH en el carboxilo terminal parece ser el sitio de regulación por fosfolípidos. Estas isoenzimas de las GRKs, también se regulan por el dímero  $\beta\gamma$  [Onorato *et al*, 1995; Debburman *et al*, 1996]. Mientras que los fosfolípidos por sí solos pueden activar a estas enzimas, la estimulación a través del dímero  $\beta\gamma$  requiere al mismo tiempo de la presencia de los fosfolípidos [Pitcher *et al*, 1998; Debburman *et al*, 1996; Pitcher *et al*, 1995]. La movilización de las GRKs 2 y 3 hacia la membrana puede ser bloqueada por la sobre expresión del dominio de unión al dímero  $\beta\gamma$ , ubicado en el carboxilo terminal de la GRK2 [Daaka *et al*, 1997].

Varios estudios han determinado los sitios de fosforilación por las GRKs en diferentes receptores acoplados a proteínas G. En receptores tales como la rodopsina [Oguro *et al*, 1993], el  $\beta_2$ -adrenérgico y el  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico [Fredericks

*et al*, 1996; Diviani *et al*, 1997] y los receptores para somatostatina [Roth *et al*, 1997] los sitios de fosforilación se encuentran en el carboxilo terminal. En otros receptores acoplados a proteínas G, por ejemplo en los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos [Eason *et al*, 1995] y en los receptores muscarínicos m2 [Pals-Rylaarsdam y Hosey 1997], los sitios de fosforilación se encuentran en la tercera asa intracitoplásmica.

b) Papel de las GRKs en la regulación de los receptores acoplados a proteínas G: el modelo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico.

El receptor  $\beta_2$ -adrenérgico se ha estudiado como modelo de los receptores acoplados a proteínas G no visuales [Lefkowitz, 1998]. El receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, en presencia de adrenalina o noradrenalina, activa a una proteína  $G_s$ , el dímero  $\beta\gamma$  liberado facilita que las GRKs 2 y 3 migren hacia la membrana plasmática, donde estas cinasas fosforilan al receptor en su carboxilo terminal. Subsecuentemente, proteínas conocidas como arrestinas se unen al receptor fosforilado, impidiendo que exista una interacción adicional entre el receptor y la proteína G, a este estado se le conoce como estado desacoplado [Freedman y Lefkowitz, 1996; Sterne-Marr y Benovic, 1995; Chuang *et al*, 1996]. La unión de las arrestinas al receptor favorece el direccionamiento de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos a vesículas cubiertas con clatrina, debido a que las arrestinas tienen dominios de unión a clatrina en el carboxilo terminal [Ferguson *et al*, 1996; Goodman *et al*, 1996]. La internalización de estos receptores es promovida por dinamina, una proteína motora que rodea a las vesículas cubiertas con clatrina y participa en la constricción de las vesículas para que se lleve a cabo el proceso clásico de endocitosis [Urrutia *et al*, 1997]. La internalización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos se requiere para su resensibilización; el ambiente ácido de los endosomas hace que el receptor sufra un cambio conformacional que permite que una fosfatasa específica desfosforile a los receptores [Pitcher *et al*, 1995; Krueger *et al*, 1997]. Esta desfosforilación facilita que los receptores sean reciclados a la membrana plasmática, quedando así listos para otro ciclo de transducción de señales. Alternativamente, después de ser internalizado, el



receptor puede ser degradado en los lisosomas (Figura 5).

Es importante señalar que los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos internalizados adquieren capacidad de acoplamiento con proteínas de la familia  $G_i$ , este evento parece indispensable para que estos receptores activen a la vía de transducción que lleva a estimular a la cinasa activada por mitógenos (MAPK). Este es un ejemplo interesante de que mientras se desensibiliza a una vía de transducción se adquiere la habilidad para estimular a otra [Daaka, 1997].

Otros receptores cuya fosforilación por GRKs ha sido demostrada, son los receptores muscarínicos m2 y m3, los receptores  $ET_A$  y  $ET_B$  para endotelina [Freedman *et al*, 1997], los receptores  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos [Diviani *et al*, 1996], los receptores para trombina [Ishii *et al*, 1994] y los receptores para angiotensina II [Oppermann *et al*, 1996; Ishizaka *et al*, 1997].

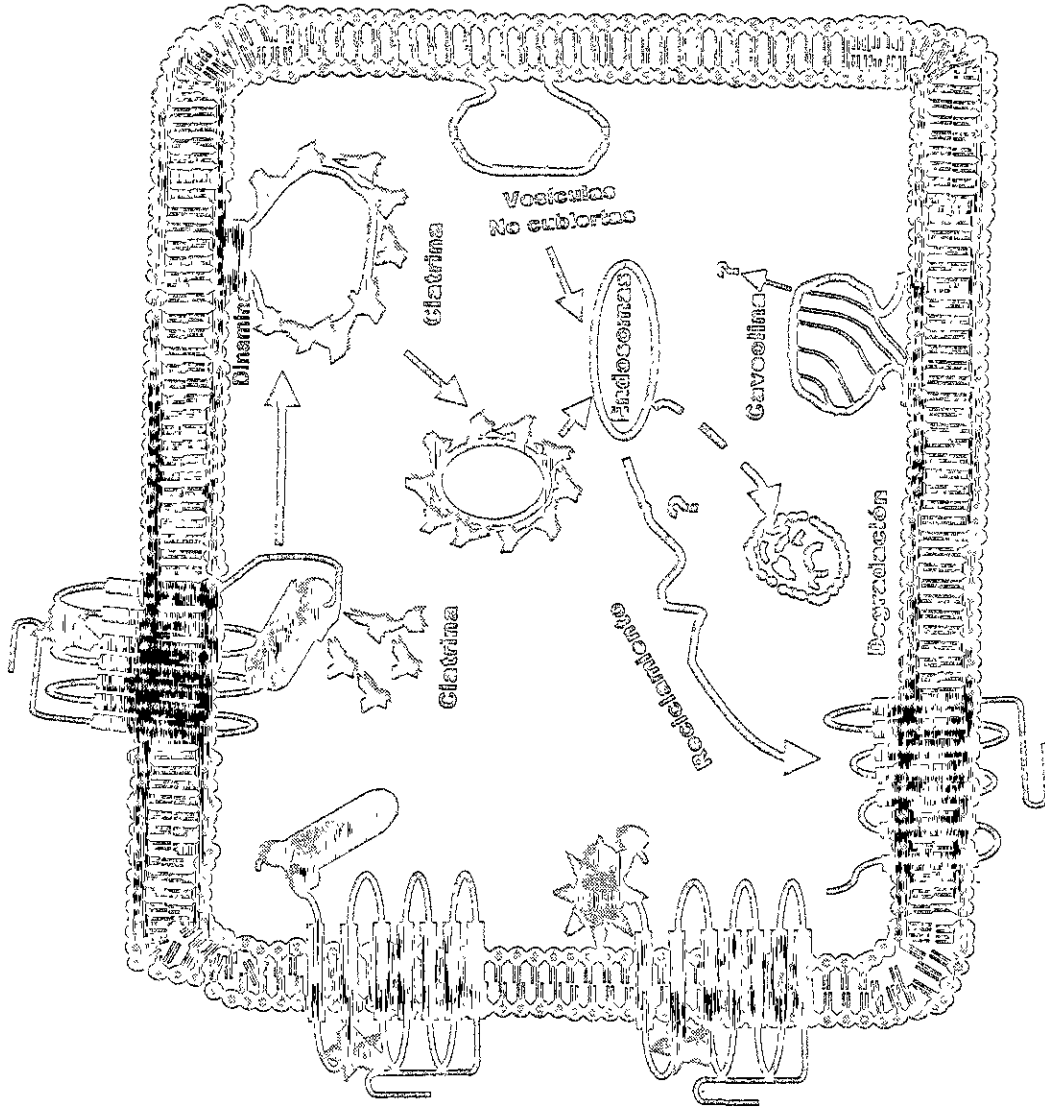


Figura 5. Representación esquemática de la desensibilización, la resensibilización y los mecanismos alternativos de internalización. IL= ligando; GRK= cinasas que fosforilan al receptor en residuos de serina y troonina; ?= no se sabe que determina que el receptor se degrade o se recicle a la membrana. ?= no se sabe a donde van los receptores que se encuentran en las caveolas; Y = clatrina. La descripción de los procesos se encuentra en el texto.

### c) Las arrestinas:

Bajo condiciones fisiológicas, la fosforilación mediada por GRKs no es suficiente para la inactivación total del receptor. La desensibilización se consigue mediante la intervención de un cofactor que impide que siga transduciendo la señal, a este co-factor se le llamó arrestina. Actualmente, es indudable la importancia de estas proteínas en la desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G en células intactas [Pippig *et al*, 1993; Zhang *et al*, 1997].

La familia de las arrestinas incluye por lo menos 6 miembros que han sido clasificados de acuerdo a su homología y distribución tisular: 1) la arrestina visual, localizada principalmente en la retina, puede encontrarse en células pineales y leucocitos; 2) las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 son más ubicuas pero se encuentran mayoritariamente en el tejido nervioso y linfático; 3) la arrestina de los conos (C o X-arrestina) se encuentra principalmente en los conos de los fotorreceptores y también en células pineales, en la pituitaria y en el pulmón; y 4) arrestina-D y E que se expresan ampliamente. [Ferguson *et al*, 1996].

Las arrestinas son proteínas citoplasmáticas que migran hacia la membrana plasmática para unirse a los receptores acoplados a proteínas G activados. Este evento depende de la fosforilación de los receptores por la GRKs y promueve su internalización. La fosforilación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico por la GRK2 incrementa de 10-30 veces la afinidad de la  $\beta$ -arrestina por el receptor, mientras que la unión del agonista al receptor tiene un menor efecto en este tipo de interacción [Lohse *et al*, 1992; Gurevich *et al*, 1995]. Las arrestinas contienen múltiples sitios que son sustrato de proteínas cinasas. Los elementos estructurales que contribuyen a la unión de las arrestinas con los receptores incluyen a un dominio denominado P que permite el reconocimiento del receptor fosforilado; el dominio A que es el sitio de reconocimiento del receptor en su forma activada por el agonista. El dominio A de las arrestinas interacciona con el receptor en múltiples sitios que incluyen a la primera y a la tercera asas intracelulares [Gurevich *et al*, 1994; Krupnick *et al*, 1994]. Cuando las arrestinas se unen al receptor por estos dominios, inducen cambios conformacionales que

dejan al descubierto, al dominio S (dominio de reconocimiento de la fosforilación). Estos cambios conformacionales también permiten la interacción de los dominios reguladores en el amino terminal (R1) y carboxilo terminal (R2). Además, las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 contienen en su carboxilo terminal un dominio de unión a clatrina.

d) Desensibilización heterológica y papel de las proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros:

La fosforilación y regulación promovida por las proteínas cinasas reguladas por segundos mensajeros se ha demostrado en muchos receptores acoplados a proteínas G [Freedman y Lefkowitz, 1996]. El ejemplo más estudiado ha sido el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, el cual es un excelente sustrato para la PKA [Stadel *et al*, 1983; Lohse *et al*, 1990]. En la mayoría de los casos, la fosforilación por proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros no parece ser influenciada por la unión del ligando al receptor. Por ejemplo, se ha sugerido que cualquier condición que eleve las concentraciones de AMPc intracelular resulta en la fosforilación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos por la PKA provocando el desacoplamiento de la proteína  $G_s$  [Lohse, 1990,1992]. Evidencias recientes han sugerido que la fosforilación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos por la PKA puede promover el acoplamiento del receptor a la proteína G inhibitoria ( $G_i$ ) [Daaka *et al*, 1997], situación que como se mencionó previamente, es necesaria para la activación de la vía de la MAP cinasa por estos receptores y requiere de su endocitosis [Daaka, *et al*, 1998].

Varios receptores acoplados a proteínas G se regulan por otro tipo de proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros, en particular por miembros de la familia de la PKC. Muchos estudios han abordado la participación de la PKC en la regulación de los receptores acoplados a proteínas G usando reguladores farmacológicos para la PKC; sin embargo, estos estudios son difíciles de interpretar ya que el efecto puede ocurrir sobre el receptor, sobre la proteína  $G_q$  o sobre la fosfolipasa C [García-Saínz 1991]. Sin embargo, es clara la participación de fosforilación de diversos receptores por la PKCs

activadas, de manera heteróloga. Tal es el caso de los receptores para angiotensina II tipo IA que se fosforilan por efecto de la PKC en células HEK 293 [Daaka, *et al*, 1998]. Un ejemplo interesante es el de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos transfectados en células rat-1 en este caso, cuando se activan a los receptores para endotelina  $ET_A$  (expresados endógenamente) se induce fosforilación de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos, promovida por la PKC, alterando su acoplamiento con la proteína G [Vázquez-Prado *et al*, 1997].

#### e) Internalización de receptores acoplados a proteínas G:

Existen evidencias que demuestran que la fosforilación de receptores acoplados a proteínas G, promovida por las GRKs, y la unión de la  $\beta$ -arrestina, son pasos cruciales para la internalización de estos receptores, como se describe en la Figura 5. Por ejemplo, en células COS, los receptores muscarínicos m2 se internalizan más cuando la GRK2 es contransfectada, en tanto que mutantes dominantes negativas de GRK2 retardan la internalización de estos receptores [Tsuga *et al*, 1994]. Resultados similares se obtuvieron con una mutante del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Y326A), que es un sustrato pobre para la GRK2 y que no es internalizado; sin embargo, la internalización se restaura cuando se sobreexpresa a la GRK2 [Ferguson *et al*, 1995]. También se recupera la internalización del receptor mutado cuando se sobre expresa  $\beta$ -arrestina [Ferguson *et al*, 1996]. Por otro lado, mutantes dominantes negativas de  $\beta$ -arrestina reducen notablemente la internalización de los receptores [Ferguson *et al*, 1996; Lin *et al*, 1997].

La sobre expresión de arrestina 2 aumenta la desensibilización del receptor muscarínico m2 [Schlador y Nathanson, 1997]. Otros resultados sugieren que el receptor muscarínico m2 en células HEK, es internalizado de forma independiente de arrestinas y no requiere dinamina [Pals-Rylaarsdam *et al*, 1997]. Resultados similares se han obtenido para el receptor tipo 1 para angiotensina II [Zhang *et al*, 1996]. El proceso de internalización de los receptores muscarínicos m2 y de los receptores tipo 1 para angiotensina II, en células HEK, contrasta marcadamente con el de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos

en las mismas células, en este caso a través de una vía dependiente de arrestinas y dinamina [Zhang *et al*, 1996]. En estudios realizados con los receptores muscarínicos m1, m3, m4 en células HEK, se observó que estos receptores son internalizados en una forma independiente de arrestina, pero dependiente de dinamina. Por otro lado, de dinamina parece importante para la movilización de los receptores localizados en invaginaciones de la membrana llamadas caveolas; tal es el caso de los receptores para endotelina A que se han localizado en las caveolas [deWaeerd y Leeb-Lundberg, 1997; Oh *et al*, 1998; Henley *et al*, 1998].

Resumiendo todos estos hallazgos, se puede decir que existen varias vías potenciales de endocitosis para los receptores acoplados a proteínas G. La unión del ligando induce fosforilación del receptor y unión de proteínas adaptadoras, mismas que pueden unirse al receptor de manera independiente de la fosforilación de éste. Posteriormente, las proteínas adaptadoras acoplan al receptor con diferentes tipos de maquinaria endocítica capaz de internalizar a los receptores a través de vías dependientes ó independientes de dinamina. En la vía dependiente de dinamina, la internalización puede ocurrir, a través de la arrestina, hacia vesículas cubiertas con clatrina ó bien a través de un adaptador aún no conocido que lleva a los receptores acoplados a proteínas G hacia otro tipo de vesículas no bien caracterizadas. Este adaptador desconocido también puede dirigir los receptores acoplados a proteínas G directamente hacia las caveolas o permitir que los receptores acoplados a proteínas G interactúen directamente con caveolina en estas estructuras membranales. Otros receptores acoplados a proteínas G son internalizados de forma totalmente independiente de dinamina por medio de adaptadores diferentes y hacia vesículas no cubiertas de clatrina [Bünemann *et al*, 1999] (Figura 5).

Tradicionalmente se había pensado que los receptores secuestrados eran incapaces de transducir señales. Se suponía que al ser removidos de su ambiente de proteínas G y efectores y resultar inaccesibles para sus ligandos, su función se veía interrumpida por la internalización. Sin embargo, se ha postulado que la internalización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos se requiere para activar

a la vía de la cinasa activada por mitógenos por medio de un cambio en su especificidad de acoplamiento por las proteínas G que pasa de  $G_s$  a  $G_i$  [Daaka *et al*, 1998]. Además la internalización permite la desfosforilación y la consecuente resensibilización. Se ha sugerido la participación de proteínas muy similares a las que inician la desensibilización (GRK y arrestina), para que se lleve a cabo la internalización de los receptores dentro de endosomas, donde se requiere un ambiente ácido para que sean desfosforilados por efecto de una fosfatasa. Aún, no son claramente conocidos los procesos involucrados en el reciclamiento de los receptores hacia la membrana después de su desfosforilación [Pitcher *et al*, 1995].

#### t) Disminución del número de receptores:

El tratamiento prolongado con agonistas trae como consecuencia la disminución en el número neto de receptores expuestos sobre la membrana, causado por la destrucción de los receptores en los lisosomas en lugar de ser reciclados (Figura 5). El proceso de destrucción de los receptores permite a las células adaptarse fisiológicamente a exposiciones prolongadas del agonista; por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento prolongado con carbacol (un agonista de los receptores muscarínicos), causa degradación de los receptores muscarínicos  $m_2$  en miocitos cardíacos [Bünemann *et al*, 1996], es interesante que este proceso ocurra en presencia de concentraciones del agonista por debajo de su  $K_d$ .

En comparación con la desensibilización por fosforilación, el proceso de disminución del número de receptores en la membrana es lento. Los eventos que pueden dar lugar a esta situación son: Degradación de los receptores, disminución en su síntesis o una combinación de ambos eventos. El tráfico de los receptores acoplados a proteínas G de endosomas tempranos a lisosomas, donde el receptor puede ser degradado, es considerado un mecanismo de degradación inducida por el agonista [Kallal *et al*, 1998]. Para que la degradación de los receptores ocurra se requieren proteínas adicionales las que participan en la desensibilización inicial ocurra. Esta posibilidad deriva de que la degradación

no siempre sigue una vez que el receptor ha sido internalizado [Hein *et al*, 1997]. Un ejemplo es el de los receptores muscarínicos m2, expresados en células HEK, estos se desacoplan rápidamente de la proteína G y son internalizados; sin embargo, los receptores no son degradados [Tsuga *et al*, 1998]. Por otro lado, en ciertos casos, las mismas proteínas adaptadoras para la internalización son requeridas para la disminución neta del número total de receptores, como ejemplo tenemos el caso del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico [Gagnon *et al*, 1998]. La disminución en el número de receptores acoplados a proteínas G también puede resultar de una disminución en los niveles de RNAm respectivos [Habecker *et al*, 1993; Danner y Lohse, 1997].

## VII. DOMINIOS PROTEICOS QUE COORDINAN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES:

Un tema que emerge del estudio de la transducción de señales es la función de los dominios proteicos encargados de interconectar a las diversas proteínas reguladoras y por lo tanto determinar la trayectoria de la transducción de señales. Estos módulos proteicos rara vez forman parte de la estructura de los receptores.

Los principales módulos proteicos que participan en la transducción de señales son los SH2, SH3 y PH. Su presencia no se restringe a proteínas particulares de la transducción de señales, sino que están presentes en proteínas cinasas, cinasas de lípidos, fosfatasas, fosfolipasas, factores de transcripción, entre otras proteínas. Los dominios SH3 y PH también se encuentran en proteínas del citoesqueleto y son encontrados en todos los organismos eucariontes, incluyendo las levaduras; los dominios SH2 no se encuentran en la levadura y ninguno de estos dominios se han encontrado en procariontes [Koch *et al*, 1991; Pawson, 1993; Musacchio, 1994].

### a) Dominios SH2:

Los dominios SH2 son regiones altamente conservadas de aproximadamente 100 aminoácidos que reconocen secuencias fosforiladas en



no siempre sigue una vez que el receptor ha sido internalizado [Rein *et al*, 1997]. Un ejemplo es el de los receptores muscarínicos m2, expresados en células HEK, estos se desacoplan rápidamente de la proteína G y son internalizados; sin embargo, los receptores no son degradados [Tsuga *et al*, 1998]. Por otro lado, en ciertos casos, las mismas proteínas adaptadoras para la internalización son requeridas para la disminución neta del número total de receptores, como ejemplo tenemos el caso del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico [Gagnon *et al*, 1998]. La disminución en el número de receptores acopiados a proteínas G también puede resultar de una disminución en los niveles de RNAm respectivos [Habecker *et al*, 1993; Danner y Lohse, 1997].

## VII. DOMINIOS PROTEICOS QUE COORDINAN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES:

Un tema que emerge del estudio de la transducción de señales es la función de los dominios proteicos encargados de interconectar a las diversas proteínas reguladoras y por lo tanto determinar la trayectoria de la transducción de señales. Estos módulos proteicos rara vez forman parte de la estructura de los receptores.

Los principales módulos proteicos que participan en la transducción de señales son los SH2, SH3 y PH. Su presencia no se restringe a proteínas particulares de la transducción de señales, sino que están presentes en proteínas cinasas, cinasas de lípidos, fosfatasas, fosfolipasas, factores de transcripción, entre otras proteínas. Los dominios SH3 y PH también se encuentran en proteínas del citoesqueleto y son encontrados en todos los organismos eucariontes, incluyendo las levaduras; los dominios SH2 no se encuentran en la levadura y ninguno de estos dominios se han encontrado en procariontes [Koch *et al*, 1991; Pawson, 1993; Musacchio, 1994].

### a) Dominios SH2:

Los dominios SH2 son regiones altamente conservadas de aproximadamente 100 aminoácidos que reconocen secuencias fosforiladas en

residuos de tirosina, los dominios SH2 se unen frecuentemente a dominios catalíticos de cinasas y fosfatasas [Pawson, 1993]. Los dominios SH2 originalmente se identificaron en cinasas de tirosinas de la familia de v-Src, en v-Fps y en v-Abi [Sadowski, 1986; Koch, 1991]. Los dominios SH2 se encuentran en estrecha cercanía con otros dominios asociados a la transducción de señales y pueden estar unidos en los primeros pasos de la transducción de señales de los factores de crecimiento. Se ha visto que la fosforilación de los receptores para factores de crecimiento, en residuos de tirosina, crea sitios de anclaje para proteínas, portadoras de dominios SH2, con función efectora o de ensamble de efectores [Mayer, 1991, Matsuda, 1991]. Por ejemplo, la asociación de la fosfolipasa C y o PI-3K con el receptor para PDGF depende de la fosforilación del receptor [Mayer *et al.*, 1991, 1992]. Existen excepciones a la regla que describe que los dominios SH2 sólo se unen a residuos de fosfotirosina, como ejemplo se tiene que en la interacción de SH2 y la proteína BCR, así como la interacción entre el dominios SH2 de Raf1 y fyn que dependen de fosforilación en residuos de serina [Cieghorn, 1994].

Otra función de la interacción proteína-proteína, a través de SH2, es la relocalización de las proteínas, por ejemplo, los receptores para el factor de crecimiento PDGF, después de ser estimulados al unirse al factor, reclutan a la fosfolipasa C y y a la PI-3K entre otros componentes del sistema de transducción en la membrana plasmática [Meisenhelder, 1989]. La interacción de los dominios SH2 con secuencias fosforiladas puede tener efecto sobre la actividad de enzimas, particularmente cinasas, ya sea induciendo cambios conformacionales o permitiendo la interacción intramolecular entre el dominio SH2 y el sitio regulador de las enzimas [Liu, 1993].

Muchas proteínas poseen un solo dominio SH2, mientras que otras tienen más de uno. Las proteínas que tienen más de un dominio pueden servir como chaperonas en la interacción de dos proteínas fosforiladas diferentes; por ejemplo, la proteína que promueve la actividad de GTPasa de Ras (GAP) ó la subunidad p85 de PI-3 K tienen más de un dominio SH2. Para el caso del receptor para PDGF que tiene en el sitio catalítico tres residuos de tirosina, la

unión de la subunidad p85 de PI-3 K al receptor ocurre exclusivamente cuando dos residuos de tirosina del sitio catalítico, se fosforilan. Cuando el tercer residuo de tirosina se fosforila, entonces se puede unir la proteína GAP [Kashishian, et al, 1992]. La activación *in vitro* de la PI-3 K utilizando fosfopéptidos sintéticos es mucho mejor si se utiliza un fosfopéptido fosforilado en dos sitios que en uno [Carpenter et al, 1993].

Recientemente se ha identificado una segunda clase de dominios de unión para fosfotirosinas en las proteínas adaptadoras Shc e IRS-1 (sustrato del receptor para insulina), a los que se les denominó dominio PTB (unión a fosfotirosina) ó PI (interacción con fosfotirosina) [Kavanaugh, 1995; Bork, 1995]. Estos dominios son diferentes al dominio SH2 y no comparten similitud en la secuencia, pero al igual que los dominios SH2, su función es la de unir a las proteínas a sitios específicos de fosfotirosinas [Zhou, 1995].

#### b) Dominios SH3:

Los dominios SH3, por su parte, son dominios de 60 a 85 aminoácidos que participan en la interacción proteína-proteína en secuencias ricas en prolina. Estos dominios frecuentemente se encuentran junto a los dominios SH2 en la misma proteína. La interacción entre estos dos dominios puede tener importancia reguladora; por ejemplo, en la cinasa Src, el dominio SH2 regula la actividad de la cinasa al formar una estructura cerrada por interacción intramolecular con una tirosina fosforilada cercana al dominio carboxilo terminal, dejando encerrado al dominio catalítico. En este caso, la desfosforilación de esta tirosina, la competencia de otras fosfotirosinas (en otras proteínas) por la unión del dominio SH2 de la cinasa Src o bien la interacción del dominio SH3 de la Src con dominios ricos en prolina en otras proteínas, mismos que son expuestos en ocasión de cambios conformacionales, llevan al "desdoblamiento" de la enzima, permitiendo la activación de la cinasa. En tal caso, es fundamental la integridad del dominio SH3 ya que mutaciones en este pueden dar lugar a la activación de la cinasa Src [Thomas, 1997]. Así pues, el dominio catalítico de la cinasa Src es mantenido en un estado inactivo a través de dos diferentes interacciones

intramoleculares con sus dominios SH2 y SH3. Por un lado el dominio SH3 se une a una región de prolinas, en el sitio de conexión del dominio SH2 con el dominio catalítico, en tanto que el dominio SH2 interacciona con la fosfo-tirosina situada en la posición 527, cercana al carboxilo terminal de la cinasa. [Cohen *et al.*, 1995; Schaffhausen, 1995].

Se ha sugerido que los dominios SH3 determinan la localización en el citoesqueleto o en la membrana plasmática de las proteínas que los presentan. Los dominios SH3 de la fosfolipasa C y son los responsables de dirigir esta proteína hacia el citoesqueleto, mientras que los dominios SH3 de la proteína Grb2 son indispensables para su localización en la membrana. En general, estos dominios regulan negativamente la actividad de las cinasas de residuos de tirosina que no forman parte de la estructura de ningún receptor [Mayer, 1993; Bar-Sagi, 1993]. Otra proteína con dominio SH3 es la dinamina; en este caso, la interacción mediada por estos dominios SH3 lleva a la activación de ésta proteína [Gout, 1993].

#### c) Dominios PH:

Por último, los dominios PH, denominados así por su homología con la proteína plaquetaria plekstrina, se encuentran en una gran variedad de proteínas de transducción de señales y del citoesqueleto. Estos dominios PH están formados por una región de aproximadamente 100 aminoácidos [Mayer, 1993; Haslam, 1993; Gibson, 1994]. Por mencionar algunos ejemplos, los dominios PH están presentes en la  $\beta$ -arrestina, la dinamina, la proteína Sos, la cinasa Btk y la cinasas GRK2 entre otras [Hyvonen y Saraste, 1997; Koshiha *et al.*, 1997; Macías, 1994; Timm, 1994]. Los dominios PH pueden mediar la interacción proteína-proteína y proteína fosfolípidos [Lemmon *et al.*, 1996; Rebecchi y Scariata, 1998].

La homología en la secuencia de los dominios PH entre diversas proteínas es generalmente baja [Musacchio *et al.*, 1993], lo que los hace parecidos, es el plegamiento de los dominios PH, que es virtualmente el mismo. Estos dominios participan en la unión de las proteínas a la membrana ya que se

unen a lípidos como el  $IP_3$  y fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato. En el caso del  $IP_3$  se une a dominios PH en una manera altamente específica y compete directamente con el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato [Lemon, 1995; Yagisawa, 1994]. El dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G tiene afinidad por varios dominios PH; por ejemplo, la unión con la GRK2 es mediada por estos dominios y esta asociación requiere de la presencia de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato [Pitcher, 1995]. Para el caso de la unión de los dominios PH con la fosfolipasa  $C\delta$ , estos se unen con alta afinidad a través del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato [Lemon, 1995]. El papel funcional de los dominios PH es conducir a sus proteínas a la membrana, donde facilitan y regulan reacciones enzimáticas; por ejemplo, la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato por la fosfolipasa  $C\delta$ . De esta forma, los dominios PH acoplan a diversos efectores en puntos de la vía posteriores a la activación del receptor. Las isoformas de la fosfolipasa  $C\beta$  también tienen dominios PH en su estructura primaria, mismos que se diferencian de los dominios de la fosfolipasa  $C\delta$  en que estos no funcionan para el anclaje a la membrana a través del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato [Runnels, 1996].

Otros ejemplos específicos de proteínas con dominios PH es el de la dinamina. La actividad de GTPasa de esta proteína motora es requerida para el desprendimiento de las vesículas endocíticas y también es estimulada por  $IP_3$  y fosfatidil inositol a través de mecanismos que requieren de los dominios PH [Rebecchi y Scarlata, 1998]. Salim y colaboradores en 1996, demostraron que los dominios PH de dinamina se unen específicamente a las vesículas compuestas de fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil serina, para la unión de estos fosfolípidos se requiere de iones calcio y magnesio. En el caso de la cinasa Btk, se cree que los dominios PH actúan como adaptadores en la unión a la membrana, esta cinasa de residuos de tirosina no tiene sitios de miristilación. La unión de dominios PH al dímero  $\beta\gamma$  *in vitro*, y la sobreexpresión de estos dominios, lleva a una reducción en la hidrólisis de fosfoinosítidos por aquellas isoformas de la fosfolipasa  $C\beta$  activadas por el dímero  $\beta\gamma$ . La interacción del dímero  $\beta\gamma$  con dominios PH, aunada a la presencia de estos dominios en diversas cinasas con especificidad para residuos de tirosina, sugiere alguna

conexión entre este tipo de cinasas con los receptores acopiados a proteínas G [Tsukada, 1994]. Además de la indudable interacción de las GRK 2 y 3 con especificidad por residuos de serina y treonina, el dímero  $\beta\gamma$  [Pfecher *et al*, 1998].

Los dominios PH de la cinasa Btk se pueden unir a isoformas de PKC que dependen de calcio ( $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II) y algunas isoformas que son independientes de este ión ( $\zeta$  y  $\epsilon$ ) [Yao *et al*, 1994]. Por otro lado, el sitio responsable de la unión de la GRK2 al dímero  $\beta\gamma$  se localiza en el carboxilo terminal de la cinasa y abarca a los dominios PH. De tal forma que este dominio ancla a la cinasa a la membrana a través del dímero  $\beta\gamma$  [Touhara *et al*, 1994; Shaw, 1996].

### VIII. CINASAS CON ESPECIFICIDAD POR RESIDUOS DE TIROSINA:

Muchas señales extracelulares se transducen gracias a la fosforilación en residuos de tirosina de receptores, adaptadores y efectores intracelulares. La fosforilación de estos residuos de tirosina resulta de la activación de cinasas específicas, (TyrK) que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a residuos de tirosina en las proteínas sustratos. Estas cinasas son componentes críticos de las vías de transducción de señales responsables de la proliferación y diferenciación celulares, en ciertos estados patológicos llevan a la transformación celular [Parsons y Parsons, 1993; Fantí *et al*, 1993]. Muchas TyrK regulan una gran variedad de respuestas celulares, además de eventos mitogénicos debidos a factores de crecimiento, activan señales que disparan respuestas tales como secreción, señales de adhesión promovidas por la matriz extracelular y señales que estimulan la motilidad celular [Erpel y Courtneidge, 1995]. La fosforilación en los receptores para factores de crecimiento y moléculas de transducción de señales intracelulares amplifica la señal por medio del acoplamiento de diversas proteínas efectoras.

Las TyrK se dividen en dos familias: a) La cinasas de residuos de tirosina constituidas como parte del dominio citosólico de los receptores para factores de crecimiento y b) las tirosinas cinasas citosólicas, también llamadas itinerantes por su capacidad de movilización hacia puntos calves donde se inicia o amplifica la transducción [Ulrich, 1990; Superti-Furgoa, 1995]. Los receptores

conexión entre este tipo de cinasas con los receptores acoplados a proteínas G [Tsukada, 1994]. Además de la indudable interacción de las GRK 2 y 3 con especificidad por residuos de serina y treonina, el dímero  $\beta\gamma$  [Pitcher *et al*, 1998].

Los dominios PH de la cinasa Btk se pueden unir a isoformas de PKC que dependen de calcio ( $\alpha$ ,  $\beta$  I y  $\beta$  II) y algunas isoformas que son independientes de este ión ( $\zeta$  y  $\epsilon$ ) [Yao *et al*, 1994]. Por otro lado, el sitio responsable de la unión de la GRK2 al dímero  $\beta\gamma$  se localiza en el carboxio terminal de la cinasa y abarca a los dominios PH. De tal forma que este dominio ancla a la cinasa a la membrana a través del dímero  $\beta\gamma$  [Touhara *et al*, 1994; Shaw, 1996].

#### VIII. CINASAS CON ESPECIFICIDAD POR RESIDUOS DE TIROSINA:

Muchas señales extracelulares se transducen gracias a la fosforilación en residuos de tirosina de receptores, adaptadores y efectores intracelulares. La fosforilación de estos residuos de tirosina resulta de la activación de cinasas específicas, (TyrK) que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a residuos de tirosina en las proteínas sustratos. Estas cinasas son componentes críticos de las vías de transducción de señales responsables de la proliferación y diferenciación celulares, en ciertos estados patológicos llevan a la transformación celular [Parsons y Parsons, 1993; Fanti *et al*, 1993]. Muchas TyrK regulan una gran variedad de respuestas celulares, además de eventos mitogénicos debidos a factores de crecimiento, activan señales que disparan respuestas tales como secreción, señales de adhesión promovidas por la matriz extracelular y señales que estimulan la motilidad celular [Erpel y Courtneidge, 1995]. La fosforilación en los receptores para factores de crecimiento y moléculas de transducción de señales intracelulares amplifica la señal por medio del acoplamiento de diversas proteínas efectoras.

Las TyrK se dividen en dos familias: a) La cinasas de residuos de tirosina constituidas como parte del dominio citosólico de los receptores para factores de crecimiento y b) las tirosinas cinasas citosólicas, también llamadas itinerantes por su capacidad de movilización hacia puntos claves donde se inicia o amplifica la transducción [Ullrich, 1990; Superti-Furga, 1995]. Los receptores

con actividad de cinasa de residuos de tirosina incluyen a los receptores transmembranales para un grupo de factores solubles de crecimiento y para hormonas, tales como: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor estimulador de colonias y el factor de crecimiento parecido a insulina [Ullrich, 1990]. Por su parte, las cinasas de residuos de tirosina citosólicas no tienen, desde luego, porciones extracelulares o transmembranales e incluyen a miembros de las familias de Src, Abl, FAK y JAKs entre otras [Superti-Furga, 1995]. Debido a que las TyrK juegan un papel clave en los procesos de transducción de señales, su actividad catalítica es finamente controlada en las células normales por otras enzimas tales como fosfatasa, otras cinasas de residuos de tirosina ó bien por cinasas de residuos de serina, además de los mecanismos autoreguladores [Ullrich, 1990].

a) Receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina:

Los receptores con actividad cinasa de residuos de tirosina son glicoproteínas transmembranales que juegan un papel clave en las vías que afectan proliferación celular, migración y metabolismo. Además de ser esenciales para el desarrollo embrionario y la regeneración de tejidos [Ullrich, 1990].

La familia de receptores con actividad cinasa de tirosina puede dividirse en dos grupos, dependiendo de su organización estructural. La mayoría de los receptores, pertenecientes a esta familia están compuestos por una cadena polipeptídica y son monoméricos en ausencia del ligando, constan de una porción extracelular a la que se unen los ligandos, una región transmembranal y una porción citoplásmica donde reside el dominio de actividad catalítica y sitios para la interacción proteínas acopladoras o efectoras. Los miembros de la subfamilia de los receptores para insulina son dímeros, unidos por puentes disulfuro, formando un heterotetámero  $\alpha_2\beta_2$ .

La porción extracelular de los receptores para factores de crecimiento exhibe una diversidad considerable entre sus miembros, típicamente ésta porción está formada de módulos proteícos, enrollados discretamente, que han



sido clasificados como dominios parecidos a la inmunoglobulina, dominios ricos en cisteína, dominios parecidos a fibronectina tipo II y dominios parecidos al factor de crecimiento epidérmico (EGF). En contraste, la porción citoplásmica es más uniforme, después de la porción transmembranal sigue una región llamada yuxtamembranal, seguida por el dominio catalítico y finalmente la región del carboxilo terminal. Las regiones yuxtamembranales y la región del carboxilo terminal tienen varios residuos de tirosina que son autofosforilados por efecto de la unión del ligando [Hubbard, 1999].

En general, la activación de receptores con actividad de residuos de tirosina cinasa requiere de dos procesos: el primero es la estimulación del receptor y el segundo es la creación de sitios de unión para proteínas efectoras. La unión del ligando lleva a la dimerización de los receptores monoméricos o al reacomodo de la estructura cuaternaria de los receptores heterotetaméricos, resultando en la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en la porción citoplásmica [Ullrich, 1990]. La fosforilación de 2 ó 3 residuos de tirosina en la asa catalítica de la cinasa del receptor (asa-A), estimula la actividad de esta enzima, mientras que la fosforilación en otros residuos de tirosina, genera sitios de unión para proteínas que contengan dominios de reconocimiento de fosfotirosina, tales como el SH2 ó el dominio PTB [Pawson, 1995]. Por ejemplo, en el receptor 1 para FGF se encuentra un sitio de autofosforilación en el carboxilo terminal, este sirve para la unión de alta afinidad de la fosfolipasa Cy a través de su dominio SH2. Esta interacción se requiere para la activación de la mencionada fosfolipasa Cy mediada por el receptor para FGF 1 [Mohmmadi, 1992; Peters, 1992]. La fosforilación de los residuos de la asa A del dominio de cinasa de los receptores es crítica para la estimulación catalítica y las funciones biológicas de los receptores para insulina, para FGF entre otros [Ellis, 1986; Mohammadi, 1996]. Una excepción son los receptores para EGF, en este caso, en la asa correspondiente, los receptores poseen residuos de fenilalanina en lugar de tirosina [Gotoh, 1992]. Una vez que el receptor se ha fosforilado, ocurre la asociación de la proteína GRB2, esta unión permite que SOS se movilice hacia la membrana plasmática y active a la proteína G de bajo peso

molecular Ras. Posteriormente, se activa la cinasa Raf que dispara la vía de señales de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), capaces de regular la transcripción de genes a través de la fosforilación de factores de transcripción (Figura 6).

#### b) Cinasas citosólicas de residuos de tirosinas:

Por otro lado, cinasas citosólicas con especificidad por residuos de tirosina, tienen dominios catalíticos altamente conservados, flanqueados por dominios reguladores. El ejemplo prototipo de esta familia es la cinasa Src, en la que estos dominios reguladores incluyen sitios de miristoilación en el amino terminal, dominios SH2 y SH3 así como una región reguladora en el carboxilo terminal.

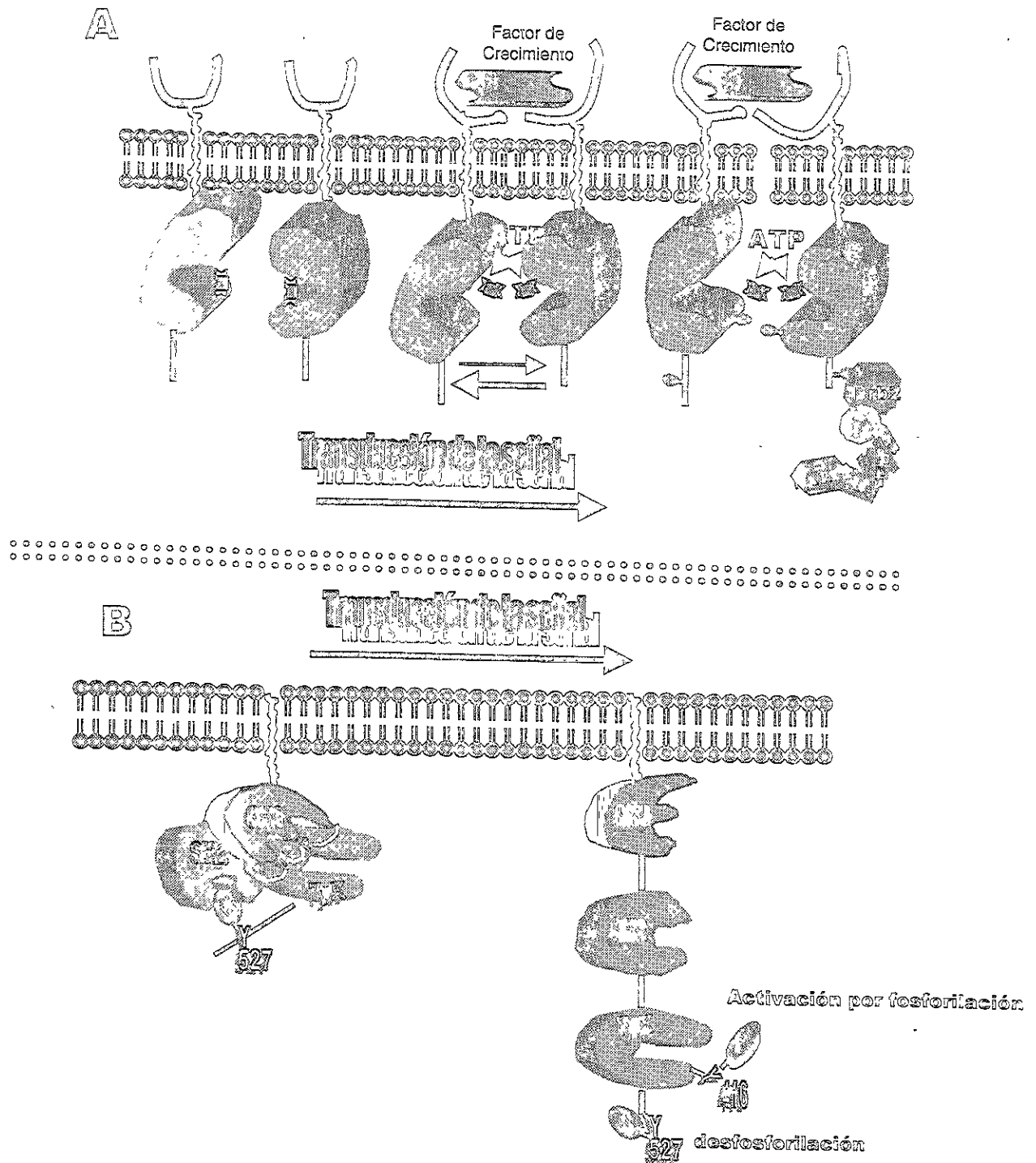
Los dominios reguladores de cinasas citosólicas de residuos de tirosina están menos definidos, pero incluyen dominios SH2 para la familia de SyK y dominios JH3 y JH7 para la familia de JAK; se cree que estos dominios participan en la distribución subcelular y en la actividad enzimática de estas cinasas. En la familia de FAK se encuentran dominios en el amino y carboxilo terminales que están pobremente caracterizados, aunque se sabe que estos dominios median interacciones proteicas y regulan la distribución subcelular de esta enzima [Jackson, 1996].

La mayoría de las cinasas de residuos de tirosina, tanto las citosólicas como las que constituyen parte de los receptores para factores de crecimiento, se activan por transfosforilación de tirosinas en el asa A. Sin embargo, el mecanismo involucrado en la transfosforilación representa variaciones sobre la dimerización de la proteína. Algunas cinasas itinerantes, como los miembros la familia de JAK, y Lck de la familia Src, son activadas por homo ó heterodimerización de receptores que conducen a la asociación no covalente de estas cinasas; ejemplo de ello son los receptores para citocinas y receptores CD4/CD8, mismos que carecen de la actividad catalítica y se sirven de las cinasas mencionadas para transducir la señal requerida ante la presencia de sus ligandos [Tomas y Brugge, 1997]. Otras cinasas citosólicas son activadas a

través eventos de transfosforilación que involucran a los receptores con acción de cinasa, tal es el caso de la activación del receptor para EGF que lleva a la activación de la cinasa Src, ó a otras familias de tirosinas cinasas citosólicas. La cinasa Src participa frecuentemente en la activación de las cinasas de las familias FAK, SyK y Btk. Estas interacciones muchas veces involucran reclutamiento de uno de los substratos de la cinasa a la membrana plasmática o bien la movilización de las cinasas cerca de la Src para su fosforilación [Mori, 1993; Alonso, 1995; Weiss, 1998].

Otro nivel de regulación de las cinasas citosólicas involucra las interacciones intramoleculares mediadas por sus dominios SH2 y SH3. Por ejemplo, un residuo de tirosina cercana al extremo carboxilo terminal de las cinasas Src funciona como un sitio de fosforilación de regulación negativa [Thomas, 1997]. El dominio catalítico de la cinasa Src es mantenido en un estado inactivo a través de dos diferentes interacciones intramoleculares con sus dominios SH2 y SH3. Mientras que el dominio SH3 se une a una región de prolina, en una región que conecta al dominio SH2 con el dominio catalítico, el dominio SH2 se une a la fosfo-tirosina situada en la posición 527, cercana al carboxilo terminal de la cinasa. La activación de la cinasa puede ocurrir por la unión a los dominios SH3 de ésta de substratos proteicos que contengan secuencias ricas en residuos de prolina y que compitan por la unión con el dominio SH2 de la tirosina cinasa. También puede activarse el sitio catalítico por unión en el dominio SH2 de otras proteínas que contengan fosfotirosina ó por desfosforilación del residuo de tirosina 527

(Figura 6) [Weiss, 1998].



**Figura 6.** Mecanismos de activación de las cinasas con especificidad por residuos de tirosina. A) La dimerización de los receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina inducida por el ligando, lleva a la transfosforilación de las tirosinas en el asa A, a la fosforilación de residuos en el segmento intracelular que permite el reclutamiento de proteínas accesorias para que se inicie la transducción de señales hacia el núcleo. B) El dominio activo de las cinasas de residuos de tirosina citosólicas permanece inactivo mediante interacciones intramoleculares con sus dominios SH2 y SH3. Por procesos de defosforilación en el residuo de tirosina 527 se activa la enzima, también se puede activar por competencia de otras proteínas con los dominios SH3. Para más detalle ver en el texto.

## IX. COMUNICACION ENTRE LAS VIAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES:

Las señales proliferativas generalmente han sido asociadas a receptores para factores de crecimiento que poseen actividad intrínseca de cinasa de residuos de tirosina [Yarden, 1986]. Sin embargo, recientemente se ha descrito que los receptores acoplados a proteínas G pueden ser mediadores importantes del crecimiento y diferenciación celulares [Dhanasekaran, 1995]. Ahora es bien conocido que muchos receptores acoplados a proteínas G regulan la cascada de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), llevando a la activación de cinasas que funcionan como reguladoras de factores transcripcionales [van Biesen, 1996; Gutkind, 1998]. Estas cinasas desempeñan un papel importante en la transducción de señales mitogénicas. Su participación se pone en evidencia al observar que si se impide su función, se detiene la proliferación celular dependiente de agentes que estimulan el crecimiento [Pages, 1993]. Esto sugiere que los receptores acoplados a proteínas G funcionan como un peñón en las vías de señales que se dirigen al núcleo y que regulan la expresión de genes.

Los receptores acoplados a proteínas G pueden promover la actividad de cinasas de residuos de tirosina e inducir la formación de complejos de transducción de señales que conducen a mitogénesis. En las vías de proliferación activadas por receptores acoplados a proteínas G participan tres clases distintas de cinasas de residuos de tirosinas (receptores para factores de crecimiento, y cinasas citosólicas de las familias de Src y FAK) que actúan como mediadores de la activación de Ras [van Biesen, 1995; Chen, 1996; Sadoshima, 1996; Daub, 1997]. Por lo menos en tres tipos de receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (receptores para PDGF, EGF y para IGF-1) se fosforilan en residuos de tirosina luego de la activación de ciertos receptores acoplados a proteínas G [Linseman, 1995; Daub, 1996; Roa, 1995]. En células Rat-1 y Cos-7, la estimulación de receptores para ácido lisofosfatídico, para endotelina-1 y para trombina induce la fosforilación de los receptores para EGF y la activación de la cinasa ERK (una de las cinasas activadas por mitógenos), lo que sugiere que la activación de receptores con

actividad de cinasa de residuos de tirosina, mediada por receptores acoplados a proteínas G, es un paso obligado en la activación de esta vía [Daub, 1997, 1996]. Después de que los receptores para factores de crecimiento se han activado, en forma independiente de la presencia de su ligando, por efecto de los receptores acoplados a proteínas G, se requiere de la unión de cinasas citosólicas como Src para que la señal arribe al núcleo. La inhibición de la Src reduce la fosforilación de cinasas intermediarias y la activación de la cinasa ERK provocada por la presencia del ácido lisofosfatídico o del EGF [Daub, 1997; Luttrell, 1996].

La vía de la cinasa activada por mitógenos responde, además de a factores de crecimiento, a receptores acoplados a proteínas G<sub>q</sub> o G<sub>i</sub> [Koch, 1994; Crespo, 1994; Faure, 1994]. Sin embargo, esta activación no depende de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G, si no que se sospecha que el dímero  $\beta\gamma$  es el intermediario responsable en la activación de esta vía [Claphan, 1997]. El dímero  $\beta\gamma$ , que activa a la MAPK, proviene de proteínas G (particularmente de la familia de G<sub>i</sub>) que actúan sobre la vía de Ras [Koch, 1994; Crespo, 1994]. Además la cinasa Src o cinasas parecidas a esta se unen al dímero  $\beta\gamma$  para activar a la vía de Ras-MAPK [van Biesen, 1995; Della Roca, 1997].

La activación de la cinasa ERK dependiente de la estimulación de distintos receptores acoplados a proteínas G ( $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos, muscarínicos m2, para dopamina D2, para adenosina A1 y para ácido lisofosfatídico) es bloqueada por la expresión por transfección, de un polipéptido derivado del carboxilo terminal de la GRK2, que secuestra el dímero  $\beta\gamma$  libre, impidiendo así la activación de Ras [Koch, 1994, van Biesen, 1995; Faure, 1994; Herrich, 1998]. La fosforilación del receptor para EGF, promovida por el receptor para ácido lisofosfatídico, se atenúa por la sobre expresión de la cinasa Csk (cinasa que inhibe a la Src) [Luttrell, 1997]. Estas evidencias experimentales apoyan la idea de que la activación de Src precede a la fosforilación cruzada del receptor para EGF [Eguchi]. Todos los ejemplos citados anteriormente, sugieren que muchos receptores acoplados a proteínas G tienen acceso a la vía de señales en las que participan Ras y que llevan a la proliferación.

Las adhesiones focales, estructuras especializadas del citoesqueleto

donde se anclan los filamentos de actina, representan una alternativa para la formación de complejos de transducción que activan a Ras, inducidos por receptores acoplados a proteínas G. En la formación de las adhesiones focales participa la FAK<sup>p125</sup> (cinasa de adhesiones focales). En fibroblastos, la estimulación de receptores endógenos para bombesina, vasopresina y ácido lisofosfatídico lleva a la activación y fosforilación de la FAK<sup>p125</sup> [Rodríguez-Fernández, 1998]. Aparentemente, la cinasa PyK2 (cinasa perteneciente a la familia de la FAK<sup>p125</sup> que es regulada por la PKC y calcio), es el punto común para la activación de la vía de la cinasa activada por mitógenos (ERK) derivada de la acción de receptores acoplados a proteínas G o de la activación de la FAK<sup>p125</sup> [Lev, 1995]. En células de músculo liso de aorta de rata, la fosforilación tanto de FAK<sup>p125</sup> como de PyK2 es seguida de la adhesión celular, la actividad de la PyK2 aumenta dramáticamente por coestimulación con ionóforos de calcio o angiotensina II [Zheng, 1998]. En células PC12 (derivadas de un feocromocitoma), la activación de la PyK2 ocurre por la estimulación de estas células con bradicinina [Dikic, 1998]. La transfección de una mutante, catalíticamente inactiva de PyK2, bloquea la activación de ERK [Lev, 1995].

Como se mencionó en una sección anterior, la desensibilización e internalización de los receptores acoplados a proteínas G son eventos que inician señales. Para el caso de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, la activación de la ERK está promovida por la desensibilización heteróloga de este receptor. La fosforilación *in vitro* de un péptido derivado de la tercera asa intracelular del  $\beta_2$ -adrenérgico, por PKA, bloquea el acoplamiento de este receptor a la proteína  $G_s$ , pero aumenta su acoplamiento a  $G_i$ , este "switch" le confiere al receptor la capacidad para activar la vía de ERK a través del dímero  $\beta\gamma$ , derivado de la proteína G sensible a toxina pertussis [Daaka, 1997]. La internalización del receptor también es crucial en este proceso, lo que queda de manifiesto por la adición de inhibidores de la endocitosis de receptores mediada por clatrina que interfieren con la activación de ERK promovida por el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y por el receptor para EGF [Ferguson, 1996; Vieira, 1997]. En células HEK 292, la expresión de mutantes dominantes negativas de  $\beta$ -arrestina o de dinamina

inhiben la internalización de receptores acoplados a proteínas G, afecta la activación de la ERK mediada por los receptores para ácido lisofosfatídico y  $\beta$ -adrenérgicos [Ferguson, 1996]. Los ejemplos mencionados sugieren que la unión de la  $\beta$ -arrestina, que termina el acoplamiento entre el receptor y la proteína G, inicia una nueva ola de señales de transducción en la cual la desensibilización del receptor funciona como un componente estructural de la compleja señal mitogénica.

Esta tesis está dedicada al estudio de los receptores humanos para bradicinina B2.

Estos receptores forman parte de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G y son capaces de estimular la vía de recambio de fosfoinosítidos conduciendo a la movilización de calcio y a la activación de la PKC. El modelo celular que utilizamos para estudiar a los receptores humanos para bradicinina B2 son células de insecto sf 21. Es relevante pues, describir en detalle a éstos receptores, así como la formación de su ligando natural: La bradicinina.

## X. FORMACION DE LA BRADICININA:

El nonapéptido bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), es el miembro más conocido de la familia de las cininas. La bradicinina, y las cininas relacionadas con esta, se encuentran entre los vasodilatadores más potentes. Se ha demostrado que participan en la regulación del flujo sanguíneo, especialmente en el riñón [Regoli, 1980; Lortie, 1992; Schölkens, 1996]. La bradicinina participa en procesos inflamatorios y patológicos tales como el asma, el dolor, alergias, y eventos traumáticos derivados de lesiones [Dray, 1993; Barnes, 1992; Polosa, 1993; Rodell, 1996]. Las cininas promueven la migración de células sanguíneas a los tejidos cuando se requiere la activación de células cebadas, fibroblastos, macrófagos y otras células del sistema inmune [Bhoola, 1992]. Estos efectos resultan de la activación de dos tipos de receptores para las cininas que se describirán con más detalle posteriormente [Regoli, 1980, Regoli, 1998].



En los mamíferos, la bradiginina se forma por dos vías, una que ocurre en el plasma y otra en los tejidos. En el plasma, las calicreinas plasmáticas liberan a la bradiginina de sus precursores, los cininógenos de alto peso molecular, cuando el factor XII de la coagulación inactivo (Factor Hageman) se une a la superficie de membranas celulares dañadas y de células endoteliales. La unión de este factor a la superficie celular promueve su activación, este factor a su vez activa a las precalicreinas para formar a las calicreinas. Las calicreinas plasmáticas entonces liberan a la bradiginina de los cininógenos de alto peso molecular por hidrólisis de uniones Lys-Arg y Arg-Ser, para dar un nonapéptido con argininas por ambos lados (amino y carboxilo terminal). El sistema de calicreinas plasmáticas también participa en la coagulación sanguínea, fibrinólisis, la regulación del tono vascular y en la inflamación [Regoli, 1980; Müller, 1989; Bhoola, 1992; Deshandra, 1998].

Por otro lado, en tejidos que han sufrido algún daño se forma Lisina-Bradiginina (Lys-Bk). En el tejido dañado, diversas enzimas proteolíticas actúan sobre las precalicreinas tisulares para dar origen a las calicreinas tisulares. Las calicreinas tisulares activadas liberan Lys-Bk de los cininógenos de bajo peso molecular. Estas enzimas hidrolizan uniones Met-Lys-Arg en el amino terminal y Arg-Ser en el carboxilo terminal, para dar un decapeptido con lisina en el amino terminal y arginina en el carboxilo terminal (Figura 7) [Regoli, 1980; Bhoola, 1992; Deshandra, 1998]. Los cininógenos de bajo peso molecular son sustratos pobres para las calicreinas plasmáticas, pero se puede formar bradiginina a partir de la Lys-Bk por la participación de las elastasas de los neutrófilos. La producción de las cininas también puede ocurrir de manera independiente al sistema de las calicreinas, donde proteasas celulares liberadas de células cebadas y basófilos, durante una inflamación aguda, estimulan la producción de las cininas [Proud, 1985; Deshandra, 1998]. Las cininas son rápidamente inactivadas por aminopeptidasas, llamadas cininasas, que se encuentran en la sangre y en los tejidos. La familia de las cininasas I (KI-CPN) remueven la Arg<sup>9</sup> de la de cinina, para producir des-Arg<sup>9</sup>-Bk, agonista del receptor B1 (ver más adelante). Mientras que el grupo de las cininasas II (KII-ACE y KII-NEP) liberan el dipéptido Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>. La cininasa II KII-ACE degrada además al carboxilo terminal remanente rompiendo la unión: Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup> [Bhoola, 1992].

# FORMACION DE BRADICININA

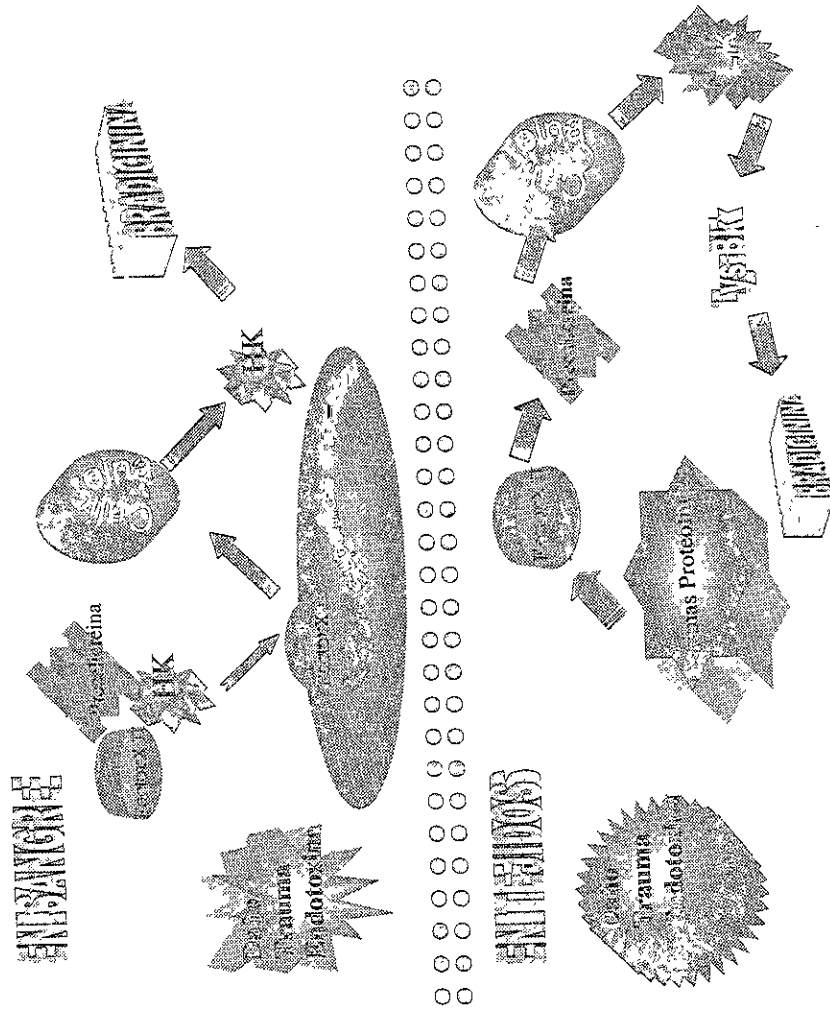


Figura 7. Formación de la Bradicina: La bradicina es liberada de los cininógenos de alto y bajo peso molecular (HK y LK respectivamente) por acción de las caliceínas plasmáticas y tisulares que son liberadas por daños en los tejidos. Las caliceínas liberan bradicina y Lys-bradicina.

#### a) Calicreínas:

Las calicreínas son un grupo de serin proteasas que se encuentran en células glandulares, neutrófilos y fluidos biológicos. Se dividen, como ya se mencionó anteriormente, en tisulares y plasmáticas y se diferencian por su peso molecular, especificidad por el sustrato, características inmunológicas y por el tipo de cinina liberada [Bhoola, 1992]. Un solo gen codifica a las calicreínas plasmáticas, mientras que las tisulares son codificadas por una familia de genes que muestran diferencias en el patrón de expresión en diferentes tejidos. Las calicreínas inactivas están contenidas en el hígado, páncreas e intestino y en su forma activa se han detectado en extractos de riñón y glándulas salivales [Regoli, 1980]. Las precalicreínas plasmáticas circulan en la sangre formando un complejo unido al factor XII de la coagulación y a los cininógenos de alto peso molecular. Después del daño vascular, los cininógenos de alto peso molecular se fijan a la superficie endotelial o tisular a través de una región rica en histidinas, esto orienta a los cininógenos de alto peso molecular hacia el factor XII de la coagulación, que al activarse forma calicreínas y factor XI de la coagulación [Bhoola, 1992]. Kaplan y colaboradores en 1972 demostraron que las calicreínas plasmáticas tienen actividad quimiotáctica para los polimorfonucleares.

#### b) Cininógenos:

En mamíferos existen 3 tipos de cininógenos: Los cininógenos de alto peso molecular, presentes en el torrente sanguíneo; los cininógenos de bajo peso molecular, localizados en varios tejidos y en la sangre y por último los cininógenos T que se encuentran solamente en las ratas. Los cininógenos son proteínas multifuncionales involucradas en la cascada de la coagulación, en los eventos de inflamación y como protectores del daño celular [Müller-Esterl, 1989]. Los cininógenos de alto y bajo peso molecular, están codificados por un solo gene y se producen por procesamiento alternativo. Los cininógenos son glicoproteínas de una sola cadena polipeptídica. Los dos cininógenos difieren entre ellos en su estructura, en su tamaño y en la susceptibilidad por las calicreínas plasmáticas y tisulares. El modelo estructural de estos cininógenos

consta de 6 dominios en los cininógenos de peso molecular alto y 5 en los de peso molecular bajo [Müller-Esterl, 1986; Bhoola, 1992]. La región de donde se liberan las cininas se encuentra en el dominio 5 de ambos cininógenos [Deshandra, 1998].

#### XI. RECEPTORES PARA BRADICININA:

Las cininas ejercen sus acciones biológicas a través de la interacción con receptores de siete dominios transmembranales, acoplados a proteínas G, conocidos como receptores para bradicinina. Estos receptores se han clasificado tradicionalmente en dos grupos: B1 y B2, de acuerdo a criterios farmacológicos [Regoli, 1980; Farmer, 1992]. Los receptores B1 y B2 comparten una homología del 36% en su secuencia de aminoácidos [Menke, 1994]. Los receptores B2 se expresan de manera endógena en muchos tipos celulares [Regoli, 1980], mientras que la expresión de los receptores del tipo B1 es inducible y ocurre después de daño tisular y como resultado de la activación del sistema de citocinas, especialmente interleucina 1 $\beta$  [Deblies, 1989; Marceu, 1995].

La activación de los receptores B1 ocasiona respuestas rápidas y agudas, tales como contracción o relajación del músculo liso; así como efectos retardados, por ejemplo la síntesis de colágena. Por otra parte, los receptores B2 son los responsables de la mayoría de los efectos biológicos de las cininas, incluyendo dilatación arterial, constricción venosa, activación de fibras sensoriales y liberación de prostaglandinas, del factor de relajación dependiente del endotelio, de noradrenalina y de otros agentes endógenos. Las características farmacológicas de los receptores B2 muestran diferencias entre las especies y se han propuesto dos subtipos, el B2<sub>A</sub> y el B2<sub>B</sub>. Los subtipos B2<sub>A</sub> y B2<sub>B</sub> se han caracterizado usando agonistas y antagonistas selectivos. El B2<sub>A</sub> se expresa en el hombre y otras especies como el conejo y el perro, mientras que el B2<sub>B</sub> se expresa en el cuyo, el hamster y la rata. El antagonista HOE 140, ampliamente usado por su especificidad para los receptores B2, no puede discriminar entre sus diferentes subtipos [Seguin, 1992; Regoli, 1993].

De acuerdo a criterios farmacológicos, varios autores han propuesto la

consta de 6 dominios en los cininógenos de peso molecular alto y 5 en los de peso molecular bajo [Müller-Esterl, 1986; Bhoola, 1992]. La región de donde se liberan las cininas se encuentra en el dominio 5 de ambos cininógenos [Deshandra, 1998].

#### XI. RECEPTORES PARA BRADICININA:

Las cininas ejercen sus acciones biológicas a través de la interacción con receptores de siete dominios transmembranales, acoplados a proteínas G, conocidos como receptores para bradicinina. Estos receptores se han clasificado tradicionalmente en dos grupos: B1 y B2, de acuerdo a criterios farmacológicos [Regoli, 1980; Farmer, 1992]. Los receptores B1 y B2 comparten una homología del 36% en su secuencia de aminoácidos [Menke, 1994]. Los receptores B2 se expresan de manera endógena en muchos tipos celulares [Regoli, 1980], mientras que la expresión de los receptores del tipo B1 es inducible y ocurre después de daño tisular y como resultado de la activación del sistema de citocinas, especialmente interleucina 1 $\beta$  [Deblies, 1989; Marceu, 1995].

La activación de los receptores B1 ocasiona respuestas rápidas y agudas, tales como contracción o relajación del músculo liso; así como efectos retardados, por ejemplo la síntesis de colágena. Por otra parte, los receptores B2 son los responsables de la mayoría de los efectos biológicos de las cininas, incluyendo dilatación arterial, constricción venosa, activación de fibras sensoriales y liberación de prostaglandinas, del factor de relajación dependiente del endotelio, de noradrenalina y de otros agentes endógenos. Las características farmacológicas de los receptores B2 muestran diferencias entre las especies y se han propuesto dos subtipos, el B2<sub>A</sub> y el B2<sub>B</sub>. Los subtipos B2<sub>A</sub> y B2<sub>B</sub> se han caracterizado usando agonistas y antagonistas selectivos. El B2<sub>A</sub> se expresa en el hombre y otras especies como el conejo y el perro, mientras que el B2<sub>B</sub> se expresa en el cuyo, el hamster y la rata. El antagonista HOE 140, ampliamente usado por su especificidad para los receptores B2, no puede discriminar entre sus diferentes subtipos [Seguin, 1992; Regoli, 1993].

De acuerdo a criterios farmacológicos, varios autores han propuesto la

existencia de subtipos nuevos de receptores para bradicinina, estos han sido denominados B3, B4 y B5 [Farmer, 1990; Regoli, 1993; Regoli, 1996]. El trabajo que aquí se presenta está dedicado exclusivamente al estudio de los receptores para bradicinina del tipo B2.

Regoli (1980), utilizando preparaciones de útero de rata e ileo de gato y cuyo, hizo las primeras descripciones de los receptores B2, mismos que fueron clasificados en términos de la interacción con sus agonistas. La afinidad por estos agonistas tiene el siguiente orden de potencia:  $\text{Tur}(\text{me}^8)\text{Bk} > \text{Bk} > \text{Lysdes-Arg}^9\text{Bk} > \text{des-Arg}^9\text{-Bk}$ . La remoción de la  $\text{Arg}^9$  del carboxilo terminal de la  $\text{des-Arg}^9\text{-Bk}$ , da como resultado a un potente agonista, la bradicinina. Los péptidos con extensiones en el amino terminal, como la  $\text{Lys-Bk}$ , pueden no mostrar cambios de afinidad o reducir 10 veces su potencia [Hall, 1992]. Los receptores B2 presentes en líneas celulares de fibroblastos de pulmón de humano (IMR 90 y WI-38) se expresan con diferentes afinidades: receptores con alta afinidad ( $K_d$  de 440 pM), afinidad intermedia ( $K_d$  de 5.6 nM) y afinidad baja ( $K_d$  de 42 nM) [Baezinger *et al*, 1992; Dalemar *et al*, 1996]. Aparentemente, la expresión diferencial de los receptores con distintas afinidades está modulada por la PKC y la PKA [Dalemar, 1996].

El estudio farmacológico de los receptores B2 ha llevado a la síntesis de tres generaciones de antagonistas:  $\text{des-Arg}^9$  [ $\text{Hyp}^3$ ,  $\text{Dphe}^{5,8}$ ,  $\text{Leu}^7$ ]-Bk, WIN 64338 y HOE 140. Los dos primeros son antagonistas competitivos y sirven para diferenciar entre los subtipos de receptores B2, mientras que el HOE 140, actúa como antagonista no competitivo en especies diferentes al humano [Regoli, 1996].

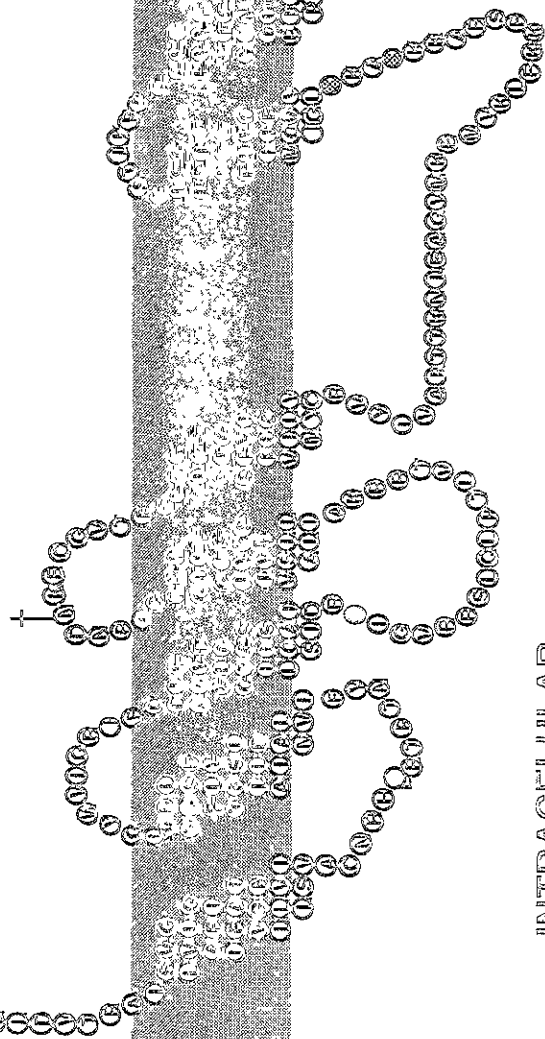
Los primeros estudios destinados a conocer el sistema de transducción de señales empleado por los receptores B2 fueron hechos por Mahan en 1990. En dichos experimentos, el RNAm de fibroblastos 3T3 fue transferido a ovocitos de *Xenopus* cargados con  $^{45}\text{Ca}$ . En estas células, la bradicinina aumentó la concentración de  $\text{iP}_3$  y la liberación de calcio, estos efectos se inhibieron con antagonistas específicos para receptores tipo B2 y no se inhibieron con antagonistas para receptores tipo B1. El tamaño del RNA mensajero para los

receptores B2 (4.5 Kb) fue determinado por análisis de northern-blot en muestras provenientes de útero de rata, de fibroblastos humanos (WI-38) y de células NG108-15 [Phillips, 1992].

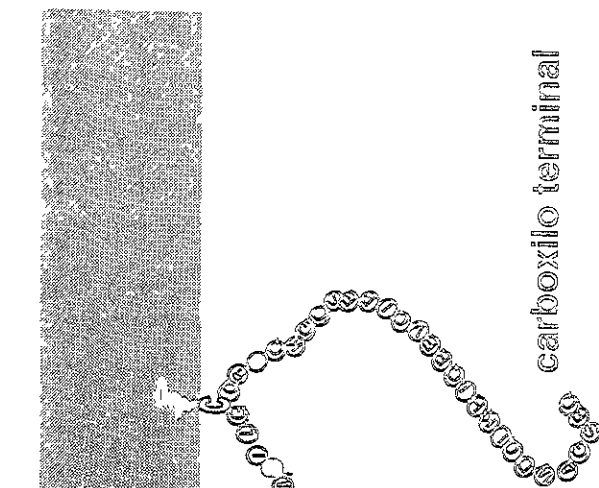
La clonación del cDNA que codifica para los receptores B2, a partir de muestras de útero de rata, reveló que este receptor pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, consta de 366 aminoácidos y tiene un peso molecular esperado de 41.5 kDa. La secuencia del receptor B2 contiene sitios probables de fosforilación por PKC y PKA [McEachern, 1991; Borkowski, 1995]. La clonación posterior del receptor B2 de origen humano demostró que éste comparte las características del de rata (81% de homología), consta de 364 aminoácidos y tiene un peso molecular esperado de 42 kDa [Hess, 1992]. El receptor B2 humano está codificado por un solo gen que consta de 3 exones [Kammerer, 1995]. En la rata, el número de exones es de 4, de los cuales el tercero sufre procesamiento alternativo para dar origen al mismo tipo de receptor [Pesquero, 1994]. Del análisis de las secuencias de los receptores B2 clonados se derivan varias inferencias estructurales. Las cisteínas 102 y 184 podrían estar formando un enlace disulfuro. Los sitios probables para fosforilación por PKC y PKA se encuentran en las posiciones: Thr 170, Ser 316, Thr 237 y Thr 342. Dos sitios de glicosilación están presentes en el extremo amino terminal y uno en la segunda asa extracitoplásmica (Asn3, Asn12 y Asn 180). La glicosilación provoca un aumento en el peso molecular del receptor que va de 71 a 81 kDa (Figura 8).

EXTRACELULAR

amino terminal



INTRACELULAR



carboxilo terminal

Figura 8. Modelo del receptor B2 para bradicinina.

El amino terminal del receptor se sitúa en el lado extracelular de la membrana plasmática, el carboxilo por el lado intracelular. Los siete dominios transmembranales están interconectados por las asas extra e intracelular. Los aminoácidos que forman la secuencia del receptor están representados por el código de una sola letra. † = sitios de glicosilación. G = sitio de palmitoilación.

O = residuo de tirosina. O = residuo de serina. O = residuo de treonina.



El sitio de unión para la bradicinina, en los receptores B<sub>2</sub>, ha sido determinado mediante el uso de diversos agonistas y antagonistas. La bradicinina interacciona con una región amino terminal de la tercera asa extracelular y con el extremo carboxilo del VI segmento transmembrana: [Abd Alla, 1993, 1996; Leeb, 1997; Novotny, 1994]. Por otro lado, experimentos de entrecruzamiento químico han permitido asumir que el sitio de unión para la bradicinina se encuentra adyacente a residuos de cisteína [Herzing, 1995].

Los receptores para bradicinina del tipo B<sub>2</sub> se acoplan al recambio de fosfoinosítidos-calcio. Este mecanismo de transducción, que fue descrito en una sección anterior, resulta en la hidrólisis de fosfolípidos a través de la fosfolipasa C $\beta$ , con la consecuente formación de IP<sub>3</sub> y diacil glicerol y en la movilización de calcio intracelular [Farne, 1992; Yang, 1994; Pyne, 1993] (Figura 3). En numerosos tejidos, los receptores B<sub>2</sub> estimulan a la fosfolipasa A<sub>2</sub> que libera ácido araquidónico [Burch, 1990; Farmer, 1991; Ricupero, 1993]. No se conoce si varios receptores individuales se acoplan a vías de transducción separadas y específicas o si el mismo receptor es capaz de activar a más de una proteína G. En este sentido, en células endoteliales de aorta de bovino se determinó que proteínas G heterotriméricas, de las familias de G $\alpha_i$  y G $\alpha_q$ , median las respuestas celulares de la bradicinina. Estos resultados fueron obtenidos utilizando anticuerpos dirigidos contra varios tipos de proteínas G [Liao, 1993]. Por otro lado, estudios de Liebman en 1994, determinaron que receptores para bradicinina, mismos que varían en su afinidad por el agonista, están acopladas a vías de transducción diferentes; de acuerdo a estos estudios, los receptores con afinidad de 30 pM inhibieron a la adenilato ciclasa a través una proteína G sensible a toxina pertussis (posiblemente G $_i$ ) y los receptores con afinidades en el rango nanomolar (>1nM) fueron los responsables de la hidrólisis de fosfoinosítidos.

Los receptores B<sub>2</sub>, al igual que muchos otros receptores acoplados a proteínas G, sufren desensibilización inducida por la presencia continua de su ligando. En fibroblastos 3T3 de rata, que poseen alrededor de 40,000 receptores para bradicinina por célula, esta hormona se une a ellos con alta afinidad (Kd de

2 nM). En este modelo celular, la exposición prolongada a bradicinina reduce el número de receptores de alta afinidad en la membrana a un nivel no detectable en 2 hrs. Este decaimiento de receptores de alta afinidad ocurre en paralelo con la aparición de receptores de baja afinidad ( $K_d$  de 42 nM). Estos resultados indican que la exposición al ligando causa una desensibilización de los receptores B2 por alteración en su afinidad por la bradicinina [Roberts, 1991]. En células NG108-15 los receptores B2 también sufren desensibilización inducida por la bradicinina; en este caso, la desensibilización es rápida, cinco minutos de incubación con la bradicinina son suficientes para reducir la concentración de receptores de 240 fmol/mg de proteína a 71 fmol/mg de proteína [Wolsing, 1991]. En células DDT<sub>1</sub>-MF-2 (que provienen de músculo liso de hamster) y en fibroblastos humanos ocurre una internalización rápida de los receptores B2 seguida de reciclamiento de los mismos [Roscher, 1984; Muñoz, 1992].

La presencia continua de bradicinina resulta en una internalización rápida de los receptores B2. Aparentemente tanto los receptores B2 como la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G se movilizan hacia las caveolas [de Weerd, 1997]. El receptor B2 tiene secuencias localizadas en el extremo carboxilo terminal que son necesarias y suficientes para permitir la internalización de este receptor [Faussner, 1998]. En células COS, CHO y HEK 293, los receptores B2 expresados por transfección, y que han sido modificados por mutaciones tales como deleciones y sustituciones de serinas y treoninas por alaninas situadas entre los aminoácidos 335 al 351 del extremo carboxilo terminal, muestran deficiencias en el proceso de internalización que siguen los receptores silvestres al ser estimulados con la bradicinina. Estos datos sugieren que la bradicinina promueve la internalización del receptor B2 por fosforilación homóloga [Pizard, 1999].

Por otro lado, se ha sugerido la participación de la PKC en la regulación del receptor B2. En células MDCK, la activación farmacológica de la PKC resulta en una disminución de la efectividad de la bradicinina para inducir movilización de calcio intracelular a través de los receptores B2 [Luo, 1999]. Por otro lado, la estimulación repetida de los receptores B2 lleva a una reducción del 70 % en la

efectividad de la respuesta, tomando como referencia el aumento en la concentración intracelular de calcio debido a la primera aplicación del agonista. La esfingosina, que actúa como inhibidor de la PKC, disminuye la desensibilización debida a estímulos repetidos con bradicinina, sugiriendo la participación de la PKC en el proceso de desensibilización homóloga [Luo, 1999]. En astrocitos, las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$  de la PKC participan en la regulación de los receptores B2, en tanto que la isoforma  $\zeta$  no parece afectar la actividad de estos receptores, esta afirmación se deriva de estudios en los que se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las diversas isoformas de la PKC [Ching-Chow, 1995]. En este sentido, otro estudio, demostró que las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de la PKC modulan la movilización de calcio intracelular inducido por el receptor B2 para bradicinina [Sakai, 1992].

En fibroblastos humanos HF-15, la fosforilación de los receptores B2, inducida por la bradicinina, ocurre en residuos de serina y treonina y no parece estar influenciada por la PKC. La cinasa GRK-2 (también conocida como  $\beta$ ARK1) fue capaz de fosforilar *in vitro* a estos receptores, permitiendo suponer su participación en la desensibilización homóloga del receptor B2 en estas células [Blaukat, 1996]. Recientemente, el grupo de Müller-Esterl demostró que los receptores B2, expresados en células de insecto Sf9, son fosforilados por estimulación con el agonista, esta fosforilación se bloqueó por efecto del antagonista HOE 140 [Blaukat, 1999]. El mismo grupo, en el presente año, contribuyó a la demostración, por análisis de espectroscopía de masas, que el receptor B2 de rata, se encuentra fosforilado en varios residuos: Ser<sup>365</sup>, Ser<sup>371</sup>, Ser<sup>378</sup>, Thr<sup>374</sup>, Tyr<sup>352</sup> y Tyr<sup>161</sup>. Esta técnica permitió determinar la residuos de palmitoilación en la Cys<sup>356</sup> (residuo conservado en el carboxilo terminal de muchos receptores acoplados a proteínas G que permite que parte del extremo carboxilo terminal se ancle a la membrana y forme una cuarta asa intracelular). Todos los sitios de fosforilación, excepto la Tyr<sup>161</sup>, se encuentran en el carboxilo terminal (Figura 8). Estos datos apoyan resultados previos en los que con anticuerpos antifosfotirosina se detectó reactividad en receptores B2 aislados de extractos de células WI-38 provenientes de fibroblastos de pulmón de humano

[Jong, 1993].

La fosforilación en residuos de tirosina se considera parte de un mecanismo regulador de la función de ciertos receptores acoplados a proteínas G, particularmente en el caso de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos esta modificación puede influir en su desensibilización [Valiquette *et al*, 1995]. El grupo de Polgar determinó la importancia de dos residuos de tirosina, altamente conservados, localizados en regiones intracelulares del receptor B2; uno de ellos, en la posición 131, es crucial para la transducción de la señal, la mutación de éste reduce el recambio de fosfoinosítidos y liberación de ácido araquidónico promovido por la bradicinina. Estos hallazgos permiten suponer que este aminoácido juega un papel importante en el acoplamiento con la proteína G. La sustitución de la segunda tirosina, en la posición 322, así como la delección de una porción del extremo carboxilo terminal (donde se ubican serinas y treoninas en secuencias consenso de fosforilación) parecen jugar un papel significativo en la internalización del receptor [Prado, 1997].

En fibroblastos 3T3, la bradicinina, a través de receptores B2, conduce a la fosforilación, en residuos de tirosina, de un grupo de proteínas entre las que se han identificado a la cinasa FAK<sup>p125</sup> y a la proteína del citoesqueleto paxilina [Leeb-Lundberg, 1991; Leeb-Lundberg, 1993]. En fibroblastos humanos de piel, la bradicinina lleva a la fosforilación de estas mismas proteínas, además de que incrementa la actividad enzimática de las cinasas FAK<sup>p125</sup> y pp60<sup>c-Src</sup> [Rodríguez-Fernández, 1996]. La bradicinina también induce la fosforilación de la cinasa PyK2 que al formar un complejo con Src parece conectar a los receptores B2 para bradicinina con la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) [Dikic, 1996].

## XII. JUSTIFICACION:

Considerando que: La estimulación de los receptores B2 para bradicinina induce la activación de cinasas con especificidad por residuos de tirosina, la sustitución de tirosinas intracelulares en la secuencia de estos receptores tiene efectos dramáticos en su capacidad para acoplarse a la vía de recambio de fosfoinosítidos calcio y que, aún cuando se ha detectado que estos receptores pueden ser sustratos de fosforilación en residuos de tirosina, el efecto de estas modificaciones en la regulación de su actividad es aún objeto de debate, hemos considerado relevante investigar la participación de cinasas de tirosina en la desensibilización de los receptores B2.

## XIII. OBJETIVOS:

Considerando que los receptores para bradicinina del tipo B2 se acoplan al recambio de fosfoinosítidos-calcio y activan cinasas con especificidad por residuos de tirosina, decidimos establecer un modelo celular en el que se reprodujeran las características farmacológicas y de actividad celular de los receptores B2 con la finalidad de investigar si las cinasas con especificidad por residuos de tirosina, activadas por los receptores B2, tienen algún efecto regulador sobre la actividad de estos receptores.

### a) Objetivos particulares.

- Expresar el receptor para bradicinina tipo B2 humano en células sf21 de insecto por infección con baculovirus en los que fue clonado.
- Determinar las características farmacológicas y funcionales de los receptores B2 recombinantes.
- Estudiar la participación de cinasas de tirosina en la regulación del receptor para bradicinina tipo humano B2.
- Determinar el papel de la fosforilación en la regulación del receptor para bradicinina tipo B2 humano.

## XII. JUSTIFICACION:

Considerando que: La estimulación de los receptores B2 para bradicinina induce la activación de cinasas con especificidad por residuos de tirosina, la sustitución de tirosinas intracelulares en la secuencia de estos receptores tiene efectos dramáticos en su capacidad para acoplarse a la vía de recambio de fosfoinosítidos calcio y que, aún cuando se ha detectado que estos receptores pueden ser sustratos de fosforilación en residuos de tirosina, el efecto de estas modificaciones en la regulación de su actividad es aún objeto de debate, hemos considerado relevante investigar la participación de cinasas de tirosina en la desensibilización de los receptores B2.

## XIII. OBJETIVOS:

Considerando que los receptores para bradicinina del tipo B2 se acoplan al recambio de fosfoinosítidos-calcio y activan cinasas con especificidad por residuos de tirosina, decidimos establecer un modelo celular en el que se reprodujeran las características farmacológicas y de actividad celular de los receptores B2 con la finalidad de investigar si las cinasas con especificidad por residuos de tirosina, activadas por los receptores B2, tienen algún efecto regulador sobre la actividad de estos receptores.

### a) Objetivos particulares.

- Expresar el receptor para bradicinina tipo B2 humano en células sf21 de insecto por infección con baculovirus en los que fue clonado.
- Determinar las características farmacológicas y funcionales de los receptores B2 recombinantes.
- Estudiar la participación de cinasas de tirosina en la regulación del receptor para bradicinina tipo humano B2.
- Determinar el papel de la fosforilación en la regulación del receptor para bradicinina tipo B2 humano.

## XII. JUSTIFICACION:

Considerando que: La estimulación de los receptores B2 para bradicinina induce la activación de cinasas con especificidad por residuos de tirosina, la sustitución de tirosinas intracelulares en la secuencia de estos receptores tiene efectos dramáticos en su capacidad para acoplarse a la vía de recambio de fosfoinosítidos calcio y que, aún cuando se ha detectado que estos receptores pueden ser sustratos de fosforilación en residuos de tirosina, el efecto de estas modificaciones en la regulación de su actividad es aún objeto de debate, hemos considerado relevante investigar la participación de cinasas de tirosina en la desensibilización de los receptores B2.

## XIII. OBJETIVOS:

Considerando que los receptores para bradicinina del tipo B2 se acoplan al recambio de fosfoinosítidos-calcio y activan cinasas con especificidad por residuos de tirosina, decidimos establecer un modelo celular en el que se reprodujeran las características farmacológicas y de actividad celular de los receptores B2 con la finalidad de investigar si las cinasas con especificidad por residuos de tirosina, activadas por los receptores B2, tienen algún efecto regulador sobre la actividad de estos receptores.

### a) Objetivos particulares.

- Expresar el receptor para bradicinina tipo B2 humano en células sf21 de insecto por infección con baculovirus en los que fue clonado.
- Determinar las características farmacológicas y funcionales de los receptores B2 recombinantes.
- Estudiar la participación de cinasas de tirosina en la regulación del receptor para bradicinina tipo humano B2.
- Determinar el papel de la fosforilación en la regulación del receptor para bradicinina tipo B2 humano.

#### XIV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

Las técnicas empleadas en el presente trabajo, se detallarán en la sección de material y métodos del manuscrito: "Regulation of the Human Bradykinin B2 Receptor Expressed in sf21 Insect Cells: A possible Role for Tyrosine Kinases", actualmente en prensa en el Journal of Cellular Biochemistry y que se presenta en la sección de resultados. En resumen, los pasos experimentales seguidos se enumeran a continuación:

1. El cDNA del receptor para bradicinina tipo B2, proveniente de fibroblastos humanos, se obtuvo por una donación del Dr. William Schilling (Case Western Research University, Cleveland, Ohio, E.U.A.). La identidad de la clona se verificó por secuenciación parcial de la misma, en la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El cDNA del receptor se subclonó en el vector pBlueBac4 y se transfectó, por la técnica de la lipofectina, en células sf21 de insecto, junto al DNA viral lineal, para la recuperación de virus recombinantes:

- La subclonación se realizó por técnicas convencionales.
- Se verificó la orientación de inserción del gen que codifica para el receptor utilizando cortes con enzimas de restricción.
- Obtención de virus recombinante: El receptor subclonado en el vector de pBlueBac4 se cotransfectó con el DNA viral Bac-N-Blue en células sf21 de insecto, utilizando el sistema de expresión Max Bac de Invitrogen.
- Las clonas recombinantes se identificaron mediante análisis de formación de placas líticas.

2. Expresión del receptor para bradicinina B2 en las células sf21 de insecto y determinación del tiempo óptimo de expresión por análisis funcional:

La eficiencia de los receptores B2 recombinantes para acoplarse al sistema de transducción de señales de las células sf21 fue determinada por su capacidad para inducir, en respuesta a la hormona, la movilización intracelular de calcio. La concentración de calcio intracelular fue monitoreada por espectrofluorimetría utilizando el indicador fluorescente fura 2-AM.

3. La caracterización farmacológica del receptor para bradicinina tipo B2



humano se determinó monitoreando la respuesta celular ante dosis distintas de diferentes agonistas y antagonistas de acción conocida sobre este grupo de receptores.

4. La actividad de cinasas con especificidad por residuos de tirosina sobre la regulación de los receptores para bradicinina B2 fue determinada por análisis de la función de estos receptores en células, en membranas y por cambios en su estado de fosforilación basal.

- Se determinó el efecto de inhibidores de cinasas con especificidad por residuos de tirosina (genisteína, tirfostina) sobre la movilización de calcio intracelular provocada por el receptor B2 recombinante.
- Se investigó el efecto de cinasas con especificidad por residuos de tirosina sobre la desensibilización homóloga del receptor, para esto, se estudió el efecto de la genisteína y la tirfostina A51 sobre la movilización de calcio intracelular inducida por dosis consecutivas de bradicinina.
- Se determinó el papel de la fosforilación en la regulación homóloga de este receptor, mediante la técnica de inmunoprecipitación y el análisis de fosfoaminoácidos.
- Se determinó el acoplamiento de este receptor con las proteínas G, mediante análisis de unión *in vitro* de [<sup>35</sup>S]GTPγS, dependiente de la presencia de bradicinina, en membranas de células infectadas con el virus recombinante.

## XV. RESULTADOS:

Los resultados obtenidos se describen en el manuscrito "Regulation of the Human Bradykinin B2 Receptor Expressed in sf21 Insect Cells: A possible Role for Tyrosine Kinases" actualmente en prensa en el Journal of Cellular Biochemistry. En resumen, los resultados se enumeran a continuación y se muestran en las figuras del manuscrito e identificadas aquí por el número correspondiente en el mismo.

### a) Expresión funcional y caracterización farmacológica del receptor para bradicinina tipo B2 humano.

1. Las constantes de unión de la bradicinina por el receptor B2 recombinante fueron obtenidas por pruebas de unión del ligando radiactivo, mismas que demostraron una unión saturable y específica, la afinidad demostrada fue de  $0.66 \pm 0.166$  nM y se detectó una expresión de 2.57 pmol de receptor por miligramo de proteína membranal (Figura 1a).

1.1. El receptor para bradicinina fue identificado, por inmunoanálisis (Western Blot), como una sola banda con un peso molecular de entre 75 y 80 kDa, el anticuerpo empleado en esta prueba, dirigido contra el carboxilo terminal del receptor, no reconoció ninguna banda en membranas de células de insecto no infectadas (Figura 1b, carril B2R y Ni respectivamente).

1.2 La ubicación celular de los receptores B2 se determinó por microscopía confocal. Los receptores se identificaron en la membrana plasmática de las células sf 21 de insecto infectadas con los baculovirus recombinantes (Figura 1c).

2. El acoplamiento funcional de los receptores B2 para bradicinina, en las células sf21, se demostró por la capacidad de la hormona para inducir la movilización de calcio intracelular, la magnitud de la respuesta fue dependiente de la dosis con una  $EC_{50}$  de 50 nM, el cambio máximo en la concentración de calcio intracelular ocurrió en presencia de 100 nM de bradicinina. Concentraciones por debajo de 2.5 nM de esta hormona no produjeron ningún cambio en el calcio intracelular (Figura 2a).

2.1 El agonista para el receptor tipo B1 (Des-Arg<sup>9</sup>-Bk) no produjo cambios en la

concentración de calcio intracelular de las células sf21 que expresaban al receptor B2 (Figura 2b).

2.2 Se exploraron las características farmacológicas del receptor B2 recombinante. La respuesta a bradicinina se previno con un antagonista específico para receptores tipo B2 (N- $\alpha$ -adamantaneacetil-D-Arg<sup>9</sup>-[Hip<sup>3</sup>, Thi<sup>5,8</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]-Bk y cayó rápidamente cuando este antagonista fue aplicado en el punto máximo de la respuesta a la hormona (Figura 2c).

2.3 Por análisis de unión con el análogo del GTP no hidrolizable, marcado radiactivamente, se pudo determinar el acoplamiento funcional entre el receptor para bradicinina tipo B2 y la proteína G (Figura 2d). La bradicinina produjo un incremento de un 81% sobre el basal en la unión del GTP $\gamma$ S.

#### b) Desensibilización del receptor B2 y participación de cinasas de tirosina.

3. El receptor para bradicinina tipo B2 humano demostró estar sujeto a desensibilización homóloga en las células sf21. La bradicinina, a una concentración de 100 nM generó una respuesta típica de aumento en la concentración intracelular de calcio, un segundo estímulo con la hormona, a una concentración 4 veces mayor a la del primer estímulo, condujo a una respuesta atenuada en la liberación de calcio intracelular, en estas condiciones, la aplicación de un tercer estímulo no resultó en respuesta intracelular alguna, detectable por cambios en la concentración citosólica de calcio (Figura 3a).

3.1 Experimentos derivados de los anteriores, en los que a la segunda aplicación de la bradicinina siguió un lavado de las células para retirar al agonista, demostraron que un tercer estímulo con la hormona resultó en una activación detectable del receptor (Figura 3b).

3.2 La inhibición de cinasas con especificidad por residuos de tirosina resultó en un incremento en la actividad de los receptores B2. En experimentos en los que después de un par de aplicaciones consecutivas de bradicinina se retiró a la hormona y se incubó a las células con genisteína (un inhibidor de cinasas de tirosina), un tercer estímulo con la hormona, en presencia de genisteína, provocó que la movilización de calcio intracelular alcanzara niveles más elevados que el

control (Figura 3c).

4. La octopamina (agonista de un receptor endógeno de las células sf21) produjo movilización de calcio intracelular aún en células en las que los receptores para bradicinina habían sufrido desensibilización homóloga, como resultado de la aplicación de dos estímulos consecutivos con bradicinina, lo que indicó disponibilidad de calcio en las pozas intracelulares y corroboró la desensibilización homóloga de los receptores para bradicinina B2 (Figura 4a).

4.1 Los efectos de la bradicinina resultaron incrementados desde su primera aplicación en células pretratadas con genisteína. Los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  alcanzados fueron de  $483.17 \pm 48.20$  nM contra  $287.76 \pm$  nM (Figura 4a) en presencia y ausencia de genisteína, respectivamente. Este tratamiento no afectó la respuesta de los receptores para octopamina endógenos (Figura 4b).

4.2 La movilización de calcio promovida por una segunda aplicación de bradicinina en células pretratadas con genisteína fue de  $310.98 \pm 31.5$  nM, contra  $187.6 \pm 16$  nM en células control (Figura 4c).

4.3 El efecto de la genisteína sobre la respuesta inicial para bradicinina requirió de la disponibilidad de calcio extracelular. La genisteína solo provocó un aumento en la respuesta celular causada por una segunda aplicación de bradicinina. Los valores de calcio intracelular registrados ante un segundo estímulo fueron de  $375.97 \pm 35.86$  nM en células pretratadas con genisteína contra  $228.91 \pm 29.61$  nM en células control. Estos experimentos fueron realizados en un medio sin calcio y suplementado con EGTA (quelante del ion) (Figura 4d).

c) Papel de las cinasas sensibles a genisteína en la actividad de los receptores para octopamina y en la movilización de calcio evidenciada con tapsigargina (que inhibe a la ATPasa que captura al ión hacia el retículo).

5. La liberación de calcio promovida por dos aplicaciones consecutivas de octopamina fue equivalente en presencia y ausencia de genisteína (Figura 5a), los valores para el primer estímulo fueron de  $172.47 \pm 33.98$  nM contra  $175.97 \pm 33.34$  nM, respectivamente, lo que sugiere que la genisteína sólo afecta a los receptores para bradicinina (Figura 5b).

5.1 La acción de la taspigargina, cuyo blanco es la ATPasa de calcio residente en la membrana del retículo y cuya función es la recaptura de este ión, es independiente de la presencia de genisteína. Los valores en la concentración de calcio intracelular, alcanzados al aplicar taspigargina, fueron de  $653.42 \pm 115.90$  nM en células tratadas con genisteína y de  $742.29 \pm 110.93$  nM en células control (Figura 5 c y d).

d) Ubicación de los receptores B2 en la membrana celular.

6. Los receptores B2, visualizados por microscopía confocal, en células control y estimuladas con bradicinina, en presencia y ausencia de genisteína, permanecieron constantes durante los tiempos de exposición al agonista. Por microscopía confocal se observó tinción homogénea en las preparaciones de los diferentes tratamientos (Figura 6 paneles superiores)

6.1 En promedio, la intensidad de la fluorescencia fue de  $26.85 \pm 3.97$  para las células control, y de  $25.18 \pm 4.26$  y  $23.72 \pm 4.58$  para las células estimuladas con bradicinina, que habían sido o no, pretratadas con genisteína respectivamente (Figura 6 paneles inferiores).

e) La genisteína incrementa la fosforilación del receptor B2 y promueve el acoplamiento de éste con la proteína G.

7. El estado basal de fosforilación del receptor B2 (normalizado a 100%), se incrementó en un 133% por efecto de la bradicinina. El efecto de la hormona en células pretratadas con genisteína fue de  $262 \pm 18.63$  %. En células control, pretratadas con genisteína pero no estimuladas con bradicinina, no hubo cambios en la fosforilación basal del receptor ( $94.4 \pm 5.7$  %, Figura 7 a y b).

7.1 Los fosfoaminoácidos involucrados en este aumento de la fosforilación, son fosfotreonina y fosfoserina (Figura 7 c).

7.2 El acoplamiento entre los receptores B2 y las proteínas G fue determinado por la unión *in vitro* (dependiente del agonista) de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S a membranas de células control o estimuladas con bradicinina en presencia o ausencia de genisteína (Figura 7 d).

## XVI. MANUSCRITO:

Regulation of the Human Bradykinin B2 Receptor Expressed in Sf21 Insect Cells: A possible Role for Tyrosine Kinases.

Guadalupe Reyes-Cruz \* <sup>(1)</sup>, José Vázquez-Prado <sup>(1)</sup>, Werner Müller-Esterl <sup>(2)</sup> and Luis Vaca <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510 México. <sup>(2)</sup> Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, Johannes Gutenberg University at Mainz. Duesbergweg 6, D-55099 Mainz, Federal Republic of Germany.

Key words: Human bradykinin receptor, receptor desensitization, intracellular calcium, Sf21 cells.

Number of Figures: 7

Running Title: Bradykinin receptor regulated by tyrosine kinase.

For correspondence: \* Guadalupe Reyes-Cruz

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad Universitaria

México, D.F. 04510

Phone : (525)622-5654

Fax : (525)622-5611

e-mail : greyes@ifisiol.unam.mx

# Journal of Cellular Biochemistry

## Facsimile Transmittal Cover Sheet

Date: 14 September, 1999

To: Guadalupe Reyes-Cruz, PhD Email: greyes@ifisiol.unam.mx  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apartado Postal 70-243  
Ciudad Universitaria  
México D. F. 04510 México

Fax 525-622-5611

Phone 525-622-5654

From: C. Fred Fox Executive Editor  Phone: 310 / 825-9329 Fax: 310 / 206-1763 email: fredfox@microbio.ucla.edu	Journal of Cellular Biochemistry Dept Microbiology & Molecular Genetics University of California 1602 MSB, 609 CE Young Drive East Los Angeles, CA 90095-1489
---	---

# of Pages: 4 (including cover sheet)

Re: JCB Transmittal # 99L-045 (Reyes-Cruz et al.)

We are pleased to advise you that your revised manuscript entitled: "Regulation of the Human Bradykinin B2 Receptor Expressed in sf21 Insect Cells: A possible Role for Tyrosine Kinases," is accepted for publication as a research article in *Journal of Cellular Biochemistry*.

Your manuscript materials will be forwarded to the publisher. They will contact you regarding page proofs, reprints, and scheduled date of publication.

A Copyright Transfer Agreement (CTA) is attached here and must be completed and returned to the publisher before your paper can be published. Please forward the completed form to:

Jessica Hickman-Beard  
John Wiley & Sons Inc.  
605 Third Avenue  
New York NY 10158-0012

On behalf of the Editorial Board, thank you for your contribution. We hope that you will consider the Journal for publication of future research articles from your laboratory.

----- Executive Editors -----

Max M. Burger  
Friedrich-Miescher Institut  
Postfach 2543  
CH-4002 Basel  
Switzerland  
Phone (41) 61 697-68-50  
Fax (+1) 61 697-67-83  
burger@fmi.ch

C. Fred Fox  
Microbiology & Molec Genetics  
University of California  
1602 MSB, 609 CE Young Dr East  
Los Angeles CA 90095-1489  
Phone (310) 825-9329  
Fax (310) 206-1703  
fredfox@microbio.ucla.edu

Gary S. Stein  
Dept Cell Biology  
University of MA Medical Center  
55 Lake Avenue North  
Worcester MA 01655  
Phone (508) 856-5625  
Fax (310) 856-6800  
gary.stein@banyan.ummed.edu

Garth L. Nicolson  
Office of the Director  
Institute for Molecular Medicine  
15162 Triton Lane  
Huntington Beach CA 92649  
Phone (714) 903-2900  
Fax (714) 379-2082  
glnicoln@ix.netcom.com

----- Field Editors -----

W. Jackson Pledger  
H. Lee Moffitt Cancer Center  
& Research Institute  
12902 Magnolia Drive  
Tampa FL 36612-9497  
Phone (813) 979-3887  
Fax (813) 979-3893  
pledgerw@moffitt.usf.edu

## a) ABSTRACT

The functional regulation of the human bradykinin B2 receptor expressed in sf21 cells was studied. Human bradykinin B2 receptors were immunodetected as a band of 75-80 kDa in membranes from recombinant baculovirus-infected cells and visualized at the plasma membrane, by confocal microscopy, using an antibody against an epitope from its second extracellular loop. B2 receptors, detected in membranes by [<sup>3</sup>H-Bradykinin] binding, showed a K<sub>d</sub> of 0.66 nM and an expression level of 2.57 pmol/mg of protein at 54 h postinfection. In these cells, bradykinin induced a transient increase of intracellular calcium ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in fura 2-AM loaded sf21 cells, and promoted [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S binding to membranes. The effects of bradykinin were dose-dependent (with an EC<sub>50</sub> of 50 nM for calcium mobilization) and were inhibited by N-α-Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5,8</sup>,D-phe<sup>7</sup>]-Bk, a specific B2 receptor antagonist. When the B2 antagonist was applied at the top of the calcium transient, accelerated the decline of the peak, suggesting that calcium mobilization at this point was still influenced by receptor occupation. No calcium mobilization was elicited by 1 μM (Des-Arg<sup>9</sup>)-Bk, a B1 receptor agonist that did not inhibit the subsequent action of 100 nM bradykinin. No effect of bradykinin was detected in uninfected cells or cells infected with the wild type baculovirus. Bradykinin-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization was increased by genistein and tyrphostin A51. These tyrosine kinase inhibitors did not modify basal levels of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Homologous desensitization of the B2 receptor was observed after repeated applications of bradykinin, which resulted in attenuated changes in intracellular calcium. Besides, genistein promoted an increased response to a third exposure to the agonist when applied after washing the cells that had been previously challenged with two increasing doses of bradykinin. Genistein did not affect the calcium mobilization induced by activation of the endogenous octopamine G protein-coupled receptor or by thapsigargin. The B2 receptor, detected by confocal microscopy in unpermeabilized cells, remained constant at the surface of cells stimulated with bradykinin for 10 minutes, in the presence or absence of genistein. Agonist-promoted phosphorylation of the B2 receptor was markedly accentuated by genistein treatment. Phosphoaminoacid analysis revealed the presence of



phosphoserine and traces of phosphothreonine, but not phosphotyrosine, suggesting that the putative tyrosine kinase(s), activated by Bradykinin, could act in a step previous to receptor phosphorylation. Interestingly, genistein prevented agonist-induced G protein uncoupling from B2 receptors, determined by in vitro bradykinin-stimulated [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S binding, in membranes from bradykinin pretreated cells. Our results suggests that tyrosine kinase(s) regulate the activity of the human B2 receptor in sf21 cells by affecting its coupling to G proteins and its phosphorylation.

Bradykinin (Bk) is a vasoactive nonapeptide, generated at sites of tissue damage, that contributes to inflammation and pain. Long term actions of Bk include activation of proliferation pathways. Cellular effects of this hormone are mediated through G-protein coupled receptors characterized by their seven transmembrane spanning helices. Currently, mammalian Bk receptors are classified in two types: B1 and B2; however other types exist in non-mammalian species (Schroeder et al., 1997; Regoli et al., 1993; Regoli et al., 1994). In a wide variety of cells, Bk receptors are coupled to PTX-insensitive G proteins and phospholipase C. The release of calcium from intracellular stores, followed by influx of this cation from the extracellular space, is a typical response to the occupation of B2 receptor by agonists (Hall et al., 1992; Regoli et al., 1993; Regoli et al., 1994). In fibroblasts and endothelial cells, Bk activates diverse kinases, as a consequence of B2 receptor action, including isoforms of protein kinase C and tyrosine kinases such as Src and Fak (Lee and Villereal, 1996; Rodríguez-Fernández and Rozengurt, 1996).

Homologous desensitization of the B2 receptor by GRK-2-catalyzed serine and threonine phosphorylation was recently reported (Blaukat et al., 1996). Direct activation of protein kinase C with active phorbol esters also induced some receptor phosphorylation (Blaukat et al., 1996). Immunoblot analysis has evidenced the presence of phosphotyrosine in immunoprecipitated B2 receptors from unstimulated WI-38 human lung fibroblasts (Jong et al., 1993). In addition, specific tyrosine residues in the intracellular domains of this receptor are required for the efficient coupling of B2 to the production of inositol phosphates (Prado et al., 1997). A recent work determined the phosphorylation of these specific tyrosine residues by mass spectrometric analysis of rat B2 receptors isolated from transfected unstimulated CHO cells (Seskic et al., 1999). The ability of Bk receptors to induce activation of tyrosine and serine-threonine kinases (Lee and Villereal, 1996), the fact that some PKC isoforms are regulated by tyrosine phosphorylation (Denning et al., 1996; Zang et al., 1997) and the ability of PKC to regulate the activity of GRK-2 (Chuang et al., 1995) opens the possibility that tyrosine kinases may regulate, in a direct or indirect way, the activity of B2

bradykinin receptor.

Baculovirus mediated expression of serpentine receptors in insect cells is a useful system for the study of specificity of G-protein coupling (Barr et al., 1997; Leopold et al., 1997; Nishimura K et al., 1998 (a); Richardson et al., 1992), calcium homeostasis (Hu et al., 1994) and homologous and heterologous regulation of several G protein coupled receptors (e.g. serotonin, muscarinic, dopamine, endothelin, thrombin, histamine, neurokinin receptors) (Chen et al., 1996; Kukkonen et al., 1996, 1998; Satoh et al., 1997; Hu et al., 1994; Nishimura et al., 1998(b); Fukushima et al., 1997; Beukers et al., 1997). We explored the regulation of the human B2 receptor functionally expressed in sf21 insect cells. As expected, the recombinant B2 receptor was coupled to intracellular calcium mobilization. Bk induced homologous desensitization of the B2 receptor. Interestingly, inhibitors of tyrosine kinases increased ligand-promoted  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization, *in vitro* bradykinin-stimulated  $[^{35}S]GTP\gamma S$  binding to membranes from agonist stimulated cells and enhanced agonist-elicited phosphorylation of the B2 receptor. These data suggest a novel role for tyrosine kinases in the modulation of B2 receptor function.

## b) MATERIAL AND METHODS

### *Reagents.*

All reagents used in the present study were analytical grade. Bradykinin, (Des-Arg<sup>9</sup>)-Bk, (Des-Arg<sup>9</sup>,Leu<sup>8</sup>)-Bk, N- $\alpha$ -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>, Thi<sup>5</sup>,<sup>8</sup>,D-phe<sup>7</sup>]-Bk, Ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N',-tetraacetic acid (EGTA) and N-[2-hydroxyethyl]-piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) were purchased from SIGMA (St. Louis, MO). Genistein was purchased from RBI (Natick, MA) and tyrphostin A51 was obtained from CALBIOCHEM (La Jolla, CA). Fura-2-AM was purchased from MOLECULAR PROBES (Eugene, OR). [<sup>3</sup>H]Bk (90 Ci/mmol), [<sup>32</sup>P]-orthophosphate (8500-9120 Ci/mmol) and [<sup>35</sup>S]GTP- $\gamma$ -S (1250 Ci/mmol) were purchased from NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS.

### *Cell culture.*

Sf21 insect cells were obtained from INVITROGEN (San Diego, CA) and cultured in Grace's medium (SIGMA) supplemented with lactalbumin hydrolysate, yeastolate, 2 mM L-glutamine, 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 250 ng/ml amphotericin B (GIBCO, Grand Island, NY) as previously described (O'Reilly et al., 1992). Cells were grown on plastic tissue-culture dishes (COSTAR, Cambridge, MA).

### *Production of recombinant baculoviruses.*

The cDNA encoding the human type II bradykinin receptor (B2) was subcloned into the baculovirus vectors pBlueBac4 and pBlueBacHis2A (INVITROGEN) using standard ligation techniques (O'Reilly et al., 1992; Sambrook et al., 1989). The pBlueBacHis2A vector adds an epitope (6 amino acids) to the N-terminal domain of the B2. We used this construct to immunoprecipitate the receptor using the commercial antibody Anti-Xpress (INVITROGEN). The orientation of the cDNA was confirmed by restriction mapping. Recombinant baculoviruses were produced following the manufacturer instructions (INVITROGEN). Baculoviruses were purified twice using the plaque assay and amplified. The titer of the amplified product was determined following the expression of  $\beta$ -galactosidase (O'Reilly et al., 1992). The final virus stock was maintained at 4°C until use. The virus multiplicity of infection (MOI) used in this

study was 1. All experiments were performed between 45-54 h post-infection.

#### *[<sup>3</sup>H]Bk binding experiments.*

Receptor expression and affinity was determined by [<sup>3</sup>H]Bk saturation binding experiments as described elsewhere (Abd Alla *et al.*, 1993; De Werd and Leeb-Lundberg, 1997) Membranes from B2 receptor baculovirus-infected sf21 cells, prepared as described for [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding (see below), were obtained 54 hrs postinfection. In brief, membranes (40  $\mu$ g/tube in a final volume of 250  $\mu$ l) were incubated in 25 mM TES, pH 7.2, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM 1,10-phenantroline and 140  $\mu$ g/ml bacitracin supplemented with 0.1% BSA and increasing concentrations of [<sup>3</sup>H]Bk for 45 min at 25°C. Specific binding was determined by subtraction of nonspecific binding that occurred in the presence of 100 nM cold Bk from total binding, determined in the absence of unlabeled Bk. The bound radiolabeled ligand was separated from the free ligand by filtration over GF/C filters (SIGMA), precoated with 0.3% polyethyleneimine, using a Brandell harvester. Filters were washed three times with ice-cold 50 mM Tris, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub> buffer and bound radioactivity was determined by liquid scintillation counting.

#### *Western blotting analysis.*

Membranes from sf21 uninfected or B2-expressing cells, were resolved by SDS-PAGE in 7M urea gels and transferred to nitrocellulose sheets using semidry blotting (BIORAD). The sheets were treated as described by Abd Alla *et al.* (1996). Briefly, sheets were blocked with 50 mM Tris, 0.2 M NaCl, pH7.4 (buffer A), containing 5 % nonfat dry milk and 0.1 % Tween 20 for 1 h. Antisera against the carboxyl-terminus of B2 receptor (intracellular domain; 1 D4 AS 346/2; Abd Alla *et al.*, 1996) was diluted 1:1000 in buffer A containing 2 % bovine serum albumin. After 30 min of incubation at 37°C the nitrocellulose sheets were washed five times for 15 min each with buffer A and incubated for 30 min with peroxidase-labeled F(ab)<sub>2</sub> fragments of mouse anti-rabbit antibody (1:5000 SIGMA,). After extensive washing, bound antibody was visualized with Supersignal Ultra chemiluminescence detection kit (PIERCE).

### *Fluorescence Microscopy*

For detection of B2 receptors in sf21 cells, cells were grown on glass coverslips and infected with B2 baculovirus. The cells were washed with extracellular solution: (10 mM NaCl, 60 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM D-Glucose, 15 mM Hepes, 100 mM Mannitol, 0.1% bovine serum albumin, pH 6.2) forty eight hours postinfection and stimulated as described in figure legends. Then cells were fixed with 3.0 % paraformaldehyde in PBS for 30 min washed three times with PBS, and incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal antibody directed against aminoacids 91-105 of the second extracellular loop of the receptor (AS 276; Abd Alla et al., 1996) (1:100 dilution) in PBS supplement with 0.5% bovine serum albumin. The cells were then washed three times with PBS, and incubated for 4 h at room temperature with a secondary anti-rabbit antibody coupled to fluorescein isothiocyanate (ZYMED). The coverslips were embedded in immunofluorescence mounting medium (DAKO) onto glass slides and fluorescence was observed using an MRC 1024 BIORAD confocal microscope and analyzed with Laser Sharp ver. 2.1 T software. Uninfected Sf21 cells and B2 expressing cells where the anti-B2 antibody was omitted (negative controls) were simultaneously analyzed.

### *Intracellular calcium measurements.*

Confluent sf21 cells, expressing B2 receptor, were mechanically dispersed with a plastic pipette, and placed in the extracellular solution to a final concentration of 1.5-2 million cells/ml and incubated with 5 µM Fura-2-AM for 45 minutes at room temperature. After this, the cells were washed twice and incubated for 30 minutes in Fura-2-AM-free solution. Then the cells were washed 3-4 times and placed in the cuvette of an Aminco-Bowman series 2 luminescence spectrometer (SLM series II). The excitation wavelength alternated every second between 340 and 380 nm and the emission was collected at 510 nm. Each experiment was individually calibrated to obtain the maximum fluorescence after disrupting the cells with 0.1% Triton X-100, the minimum fluorescence was obtained after chelating the calcium in the solution with 20 mM EGTA. The values obtained with this procedure were used to calculate the intracellular calcium concentration according to previously

published equations (Grynkiewicz et al., 1985). Some experiments were made in the absence of extracellular calcium, in those experiments 5 mM EGTA was added to the extracellular solution.

#### *Phosphorylation of B2 receptors.*

Sf21 cells, grown to a density of 2 million cells/ml in 10 cm culture dishes, were infected with the B2 baculovirus as described above. The day of the experiment, cells were maintained in extracellular solution for 1 h and then incubated in 3 ml of the same solution containing [<sup>32</sup>P]-orthophosphate (0.2 mCi/ml) for 3 h at 22°C. Labeled cells were pre-incubated with genistein or vehicle and stimulated with Bk, then cells were washed twice with ice-cold PBS and solubilized with 1.0 ml of ice-cold solubilization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.05 % SDS, 50 mM NaF, 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM p-serine, 1 mM p-threonine and the protease inhibitors: leupeptin 20 μg/ml, aprotinin 20 μg/ml, PMSF 100 μg/ml, bacitracin 500 μg/ml and soybean trypsin inhibitor 50 μg/ml). The extracts were maintained for 1 h on ice; centrifuged at 12,700 x g for 15 min at 4°C, and the supernatants transferred to new tubes containing 5 μl of B2 antiserum against the carboxyl-terminus sequence of the receptor (intracellular domain; ID 4 AS 346/2; Abd Alla et al., 1996). On a different set of experiments, the supernatants of cells expressing the epitope-tagged B2 receptor were transferred to tubes containing 5 μl of the Xpress antibody (INVITROGEN). Immunoprecipitation was performed as previously reported (Vázquez-Prado et al., 1997). Briefly, tubes were incubated overnight at 4°C. Then 40 μl of Protein A agarose beads (50% slurry) were added and incubated for 1 hr at the same temperature. Beads were washed: a) five times (1 ml/each) with a solution containing: 50mM Hepes, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7.2, 1.0 % Triton X-100, 0.05 % SDS and 100 mM NaF; b) once with 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4, and c) finally once with 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4. Washed beads were incubated for 30 min at 65°C in 100 μl of Laemmli sample buffer containing 7M urea and 5% mercapto-ethanol. Samples were electrophoresed in 7M urea-containing 10 % SDS-PAGE minigels, transferred to nitrocellulose and exposed to

X-OMAT X Ray-film (KODAK) at  $-80^{\circ}\text{C}$  with an intensifying screen. The amount of phosphorylated receptor was determined by densitometric analysis of autoradiographs or by Phosphorimager analysis (MOLECULAR DYNAMICS, Storm 840).

#### *Phosphoaminoacid analysis.*

Identification of phosphoaminoacids was performed by two dimensional thin layer cellulose electrophoresis of receptors subjected to acid hydrolysis as described (Boyle et al, 1991; Vázquez-Prado et al., 1997). Immunoprecipitated phosphorylated B2 receptors, from control or stimulated cells, were electrophoresed in 7M urea-containing 10 % SDS-PAGE minigels, transferred to PVDF membranes (BIORAD) and subjected to hydrolysis in 6N HCl for 1 hr at  $110^{\circ}\text{C}$  in a volume of 200  $\mu\text{l}$ . Samples were evaporated to dryness in a vacuum concentrator (Speed Vac) and solubilized in a mixture of cold phosphoaminoacid standards (phosphoserine, phosphothreonine and phosphotyrosine, 25 nmol each). Electrophoresis was performed using 750 V for each dimension in a cooled Hoefer Supersub chamber. For these experiments, cells were labeled with 0.5 mCi/ml [ $^{32}\text{P}$ ]-orthophosphate for 5 h.

#### *Membrane preparation and [ $^{35}\text{S}$ ]GTP- $\gamma$ -S binding.*

B2 expressing cultures, washed with extracellular solution, were scraped with a rubber policeman in buffer containing: 20 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM EDTA, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, and the previously mentioned protease inhibitors. Scraped cells were disrupted with a Polytron for 30 seconds and membranes were prepared as previously described (Vázquez-Prado et al., 1997). [ $^{35}\text{S}$ ]GTP- $\gamma$ -S binding was performed as described by Wieland and Jakobs (1994). Briefly, the binding reaction was carried out for 5 min at  $30^{\circ}\text{C}$  in a volume of 250  $\mu\text{l}$  buffer (50 mM Tris, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 7.5, containing 1  $\mu\text{M}$  GDP) containing 0.2 nM [ $^{35}\text{S}$ ]GTP- $\gamma$ -S. The reactions were initiated by the addition of membranes (25  $\mu\text{g}$  protein/tube) and terminated by the addition of 2 ml of ice-cold buffer (50 mM Tris, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.5), and filtration on Whatman GF/C filters using a Brandel harvester. Nonspecific binding was determined in the presence of 100  $\mu\text{M}$  cold GTP $\gamma$ S. Filters



were washed three times and dried, and radioactivity measured with a liquid scintillation counter (BECKMAN, model LS6000SC). In some experiments, membranes were prepared from cells previously stimulated with  $\beta_k$ , in the presence or absence of genistein. Controls included unstimulated cells and cells preincubated with genistein, as described in the figure legends.

*Data analysis.*

The change in  $[Ca^{2+}]_i$  was obtained from the difference between the peak reached after agonist application and the basal level. Statistical analysis was performed by the student's *t* test using Sigma Plot software (JANDEL CORPORATION). To quantify fluorescence intensity of confocal images, the average intensity of each cell in the visual field was measured and the data were integrated using an image analysis program (VISILOG 5, NOESIS). Analysis of binding experiments and dose response curves was performed with the GRAPH PAD PRISM 2.0 software (San Diego, CA).

## e) RESULTS.

### *Functional expression of human B2 receptor in sf21 insect cells.*

The human B2 bradykinin receptor was efficiently expressed in sf21 insect cells by heterologous recombinant baculovirus system. [<sup>3</sup>H]Bk binding experiments revealed a K<sub>d</sub> of  $0.68 \pm 0.166$  nM (mean  $\pm$  SEM, three determinations by triplicate) and expression level of  $2.57 \pm 0.55$  pmol/mg (mean  $\pm$  SEM) of protein in membranes obtained 54 hr postinfection (Fig 1A). This receptor was detected by Western-blot analysis as a band of 75-80 kDa in membranes from recombinant baculovirus infected cells (Fig. 1B, lane B2R), no signal was detected in membranes from non infected cells (Fig. 1B, lane NI). The presence of the B2 receptor on the plasma membrane of unpermeabilized cells was detected by confocal microscopy using an antibody against an epitope (aminoacids 91 to 105) from the second extracellular loop of the receptor (Abd Alla et al., 1996) followed by a FITC-conjugated second antibody (Fig.1C). Only background signal was detected in B2 expressing cells incubated exclusively with the second antibody and in non infected cells incubated with the anti-B2 antibody followed by the fluorescent conjugate (data not shown). Fluorescence was detected at the plasma membrane of sf21 cells expressing B2 receptors, indicating that the mature protein reached the cell surface. In permeabilized cells staining was also visible inside the cells, likely within the endoplasmic reticulum and Golgi compartments (data not shown).

Insect sf21 cells, infected with recombinant baculovirus containing the full-length human B2 receptor cDNA, responded to a stimulation with Bk with a transient rise in the  $[Ca^{2+}]_i$ , the magnitude of the response was concentration dependent with an EC<sub>50</sub> of 50 nM (Fig. 2A). Concentrations below 2.5 nM did not produce a measurable response in  $[Ca^{2+}]_i$ . The maximum change in  $[Ca^{2+}]_i$  was obtained with 100 nM Bk. Expression of the B2 receptor in sf21 cells, tested between 45-48 h post-infection, did not modify the basal intracellular calcium compared to uninfected cells ( $190.17 \pm 9.03$  nM and  $175.98 \pm 25.71$  nM, respectively; n=15, p> 0.05). All subsequent experiments were performed within this time frame.

The specific B1 receptor agonist (Des-Arg<sup>9</sup>)-Bk (1  $\mu$ M) did not modify

basal  $[Ca^{2+}]_i$  or the response to 100 nM Bk (Fig. 2B, n=4). The response to Bk (100 nM) was completely blocked by the selective B2 receptor antagonist N- $\alpha$ -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Tni<sup>5,8</sup>,D-phe<sup>7</sup>]-Bk (N- $\alpha$ -Bk, 10  $\mu$ M; data not shown). Application of 10  $\mu$ M N- $\alpha$ -Bk at the peak of the Bk response (in the continuous presence of 100 nM Bk) resulted in a rapid decline in  $[Ca^{2+}]_i$  towards baseline (Fig. 2C). This result indicated that continuous receptor occupancy was required to maintain the  $[Ca^{2+}]_i$  response.

Functional coupling between the B2 receptor and GTP-binding proteins was studied by analyzing Bk-promoted [<sup>35</sup>S]GTP- $\gamma$ -S binding. In membranes from B2 expressing sf21 cells, 1  $\mu$ M Bk increased [<sup>35</sup>S]GTP- $\gamma$ -S binding *in vitro* by 81 % over basal levels (basal 1250.22  $\pm$  172.68 dpm/25  $\mu$ g membrane protein, Bk 2274.28  $\pm$  359.75 dpm/25  $\mu$ g membrane protein; p < 0.05 ; n=4, Fig 2D).

*Tyrosine kinase inhibitors enhanced B2 receptor induced  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization.*

Repeated applications of Bk resulted in attenuated changes in  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 3A), indicating that the B2 receptor desensitizes in the continuous presence of the agonist. This conclusion was further supported by the finding that a partial response to Bk was recovered after removing the agonist from the incubation medium and maintaining the cells in agonist-free solution for 15 min (Fig. 3B).

To study the effect of tyrosine kinase inhibitors on homologous B2 receptor desensitization, we repeated the protocol of Bk applications of 100 nM and 400 nM, removed the agonist, and incubated the cells for 15 minutes in agonist-free solution containing 10  $\mu$ M genistein during the last 10 min. Interestingly, under these conditions, the third Bk application resulted in a greater response in  $[Ca^{2+}]_i$  transients as compared to control cells (Figs. 3B and 3C).

To determine the availability of calcium from intracellular stores after repeated applications of Bk, we studied  $[Ca^{2+}]_i$  transients induced by 500  $\mu$ M octopamine in cells in which two Bk stimulations had been elicited. Octopamine signals through an endogenous receptor linked to changes in  $[Ca^{2+}]_i$  via a pertussis toxin-insensitive G protein and phospholipase C (Hu et al.,1994). Figure 4A illustrates the changes in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by two subsequent applications of 100 nM and 400 nM of Bk. Under these conditions, octopamine produced a larger transient

rise in  $[Ca^{2+}]_i$  compared to the initial Bk application (Fig. 4A). These data demonstrated that the attenuated response to repeated applications of Bk were due to homologous receptor desensitization and not to depletion of calcium stores.

To further explore the role of tyrosine kinases in agonist-promoted B2 receptor desensitization, sf21 cells were incubated with 10  $\mu$ M genistein for 2-10 minutes, then stimulated with Bk (100  $\rightarrow$  400 nM) followed by 500  $\mu$ M octopamine (Fig. 4B). Interestingly, genistein enhanced the response to the first (100 nM) and second (400 nM) Bk stimulations with no measurable effect on the octopamine response (Fig. 4B). No modification in the basal calcium concentration was induced by genistein (control =  $192.37 \pm 9$  nM; Gen =  $195.33 \pm 6.9$  nM,  $n=8$ ). In these experiments, genistein promoted a significant increase in the mobilization of calcium for both Bk applications compared to the control. The change in  $[Ca^{2+}]_i$  elicited by 100 nM Bk, in genistein pretreated cells, was  $483.17 \pm 48.20$  nM compared to  $287.76 \pm 33.54$  in control cells (Fig. 4C,  $n=12$ ;  $p < 0.05$ ). The second Bk application, in genistein pretreated cells, produced a change in  $[Ca^{2+}]_i$  of  $310.98 \pm 31.5$  nM compared to  $187.6 \pm 16$  in control cells (Fig. 4C,  $n=11$ ;  $p < 0.05$ ). Interestingly, as observed in figures 4A and 4B, a third stimulus, in this case with octopamine, gave a similar response in control and genistein pretreated cells. Suggesting regulation of B2 receptor activity by tyrosine kinase(s) at the level of receptor, or at a point of the signal transduction pathway not shared with octopamine receptors. Similar results were obtained after incubating the cells with 800 nM tyrphostin A51 for five minutes, which increased the change in  $[Ca^{2+}]_i$  for the first Bk application by  $151 \pm 8$  % ( $n=5$ ) and by  $165 \pm 11$  % ( $n=7$ ) for the second Bk application compared to control cells (data not shown).

Similar experiments were performed in the presence of 5 mM EGTA. Under these conditions, a significant increase in the response to the second application of Bk (400 nM) was observed in cells pretreated with genistein, while the first calcium transient remained uninfluenced by this tyrosine kinase inhibitor (Fig. 4D). The peak of calcium elicited by a second application of BK increased from  $228.91 \pm 29.61$  nM in control cells to  $375.97 \pm 35.86$  nM in genistein pretreated cells ( $n=5$ ;  $p < 0.05$ ). The initial effect of Bk on  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization in the

absence of extracellular calcium was unaffected by genistein ( $475.36 \pm 34.62$  and  $509.89 \pm 51.15$  nM in control and genistein treated cells respectively,  $n=5$ ;  $p=0.6$ ).

*Tyrosine kinase inhibitors did not affect octopamine or thapsigargin elicited  $[Ca^{2+}]_i$  transients.*

The effect of tyrosine kinase inhibitors was tested on the endogenous octopamine receptor and on the thapsigargin (TG) induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . As illustrated in Figure 5A, addition of 500  $\mu$ M octopamine resulted in a typical transient change in  $[Ca^{2+}]_i$ . A second addition of 500  $\mu$ M octopamine produced an attenuated calcium response, suggesting that this receptor may also desensitize.

Treating the cells with 10  $\mu$ M genistein for 10 minutes did not alter the octopamine-induced change in  $[Ca^{2+}]_i$ , suggesting that the desensitization process of this G-protein coupled receptor is not modulated by tyrosine kinases (Fig. 5A and 5B). In the presence of genistein, the first octopamine application produced a change in  $[Ca^{2+}]_i$  of  $172.47 \pm 33.98$  nM compared to  $175.97 \pm 33.34$  nM in control cells ( $p=0.94$ ,  $n=7$ ). The second application in genistein pretreated cells produced a calcium transient of  $91.66 \pm 20.58$  nM compared to  $98.65 \pm 33.22$  nM in control cells ( $p=0.82$ ,  $n=11$ ). This result is particularly interesting since the octopamine and the B2 receptors could be using the same signaling cascade (pertussis toxin insensitive G-proteins and PLC) to induce the changes in  $[Ca^{2+}]_i$  observed after agonist stimulation (Hu et al. 1994).

The TG-induced change in  $[Ca^{2+}]_i$  was also insensitive to tyrosine kinase inhibitors, suggesting that release of calcium from intracellular stores by TG and the secondary calcium influx stimulated by the release (capacitative calcium entry) were not modulated by tyrosine kinases in sf21 cells (Fig. 5C and 5D). In genistein-treated cells, after two applications of Bk, TG induced a change in  $[Ca^{2+}]_i$  of  $653.42 \pm 115.90$  nM compared to  $742.29 \pm 110.93$  nM in control cells ( $n=10$ ;  $p=0.36$ ).

*Surface expression of B2 receptors in bradykinin and genistein pretreated cells.*

The effect of genistein on internalization of B2 receptors was determined by the intensity of fluorescence using confocal microscopy. Uniform staining at the cell surface for B2 receptors was observed in Bk-treated cells in the presence or

absence of genistein, and in unstimulated cells (Fig. 6, upper panel). In control cells (basal) the mean of fluorescence intensity was  $26.85 \pm 3.97$ ;  $25.18 \pm 4.26$  for Bk stimulated cells (Bk) and  $23.72 \pm 4.58$  for genistein pretreated cells (Gen  $\rightarrow$  Bk); (Fig 6, bottom panel). These results indicated that in the time-frame in which the calcium experiments were performed no significant internalization of B2 receptor occurred.

*Genistein increased ligand-promoted B2 receptor phosphorylation and prevented agonist-induced G protein uncoupling.*

Bk-promoted phosphorylation of the B2 receptor from sf21 insect cells loaded with [ $^{32}\text{P}$ ]-orthophosphate is shown in Figure 7A. A radiolabeled band with a molecular weight of 75-80 kDa was immunoprecipitated using a B2 receptor-specific antibody (Fig. 7A). A band of a similar molecular weight was immunoprecipitated from sf21 cells expressing an N-terminally tagged B2 receptor by an antibody against the novel epitope (AntiXpress antibody, data not shown). Basal receptor phosphorylation, judged from semi-quantitative receptor autoradiography, increased in cells treated for 10 min with 1  $\mu\text{M}$  Bk (100 % vs.  $133.3 \pm 4.5\%$   $p < 0.05$ ; Fig. 7B). The Bk-stimulated phosphorylation of the B2 receptor was further increased by preincubating the cells for 10 min with genistein ( $262 \pm 18.63\%$ ,  $p < 0.05$  compared to basal and Bk; Fig. 7B) whereas in the absence of Bk, no significant effect of genistein on phosphorylation of the B2 receptor was seen ( $94.4 \pm 5.7\%$  of basal). Phosphoaminoacid analysis revealed the presence of phosphoserine and traces of phosphothreonine in Bk stimulated receptors (Bk), in receptors preincubated with genistein followed by agonist stimulation (Gen $\rightarrow$ Bk) (Fig. 7C), and in receptors isolated from control (basal) and genistein preincubated cells (not shown).

To explore the possible participation of tyrosine kinase(s) on B2 receptors-G protein coupling, we determined the effect of genistein on agonist-modulated G protein-receptor coupling. *In vitro* Bk-stimulated [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding was performed in membranes from control (basal) cells, and from cells stimulated with Bk in the absence or presence of genistein. Coupling of B2 receptors to G proteins is demonstrated by the ability of Bk to elicit *in vitro* [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding to membranes

from control unstimulated cells (Fig. 2D and Fig. 7D, left pair of bars). In membranes from cells stimulated *in vivo* with Bk, by a protocol similar to the used for calcium determination (100 nM Bk followed by 400 nM Bk), no *in vitro* stimulation by Bk was detected by [<sup>35</sup>S]GTPγS binding (Fig 7D, middle pair of bars). Bk was able to elicit *in vitro* [<sup>35</sup>S]GTPγS binding to membranes from Bk-stimulated cells that were preincubated with genistein (Fig 7D, right pair of bars).

## 6) DISCUSSION

The data presented here show that the pharmacology of the recombinant B2 receptor expressed in sf21 cells is compatible with that of the B2 receptor from human cells (Hall, 1992) and that regulation of this receptor can be reproduced faithfully in insect cells. Expression of human B2 Bk receptor in sf9 insect cells was previously reported (Kunze DL et al., 1997; Dong et al., 1995; Hu et al., 1994). In this work we provide support to the hypothesis that regulation of the activity and phosphorylation of this receptor is influenced by tyrosine kinase(s).

Some discrepancy seems to exist between the affinity of recombinant B2 receptors measured by [<sup>3</sup>H]Bk binding ( $K_d$  0.66 nM) and the efficiency of the receptors to stimulate intracellular calcium mobilization ( $EC_{50}$  50 nM). While in the vast majority of cells expressing B2 receptors a close correlation exist between these parameters, differences in some cells that naturally express B2 receptors have also been detected. Examples include phosphoinositide turnover in guinea pig gall bladder cells (Falcone et al., 1993), murine fibrosarcoma HSDM1C1 cells (Sharif and Whiting, 1993) and colon muscle cells (Hasler et al., 1995) and B2 receptor phosphorylation in human HF-15 fibroblasts (Blaukat et al., 1996). Indeed, heterogeneity in B2 receptor subpopulations defined by differences in their affinity for Bk have been reported (Baenzinger et al., 1992; Dalemar et al., 1996). Pizard et al. (1998) cited several studies that reported large variations, by > 4 orders of magnitude in the affinity constants reported for Bk ranging from 0.003 to 50 nM and explored the reasons for this heterogeneity. They suggested a mechanism of negative cooperativity. Accordingly, B2 receptor molecules likely interact with each other resulting in a decrease in the apparent affinity of the receptor for Bk due to an acceleration of bound ligand dissociation (Pizard et al., 1998). In our transfected system, it is likely that the availability of G proteins is limiting. Since an agonist was used for the binding experiments, and assuming that the process of negative cooperativity is taking place, it remains possible that receptor species with low affinity for the agonist (in the uncoupled state) remained undetected. Binding experiments in which the antagonist [<sup>3</sup>H]NPC17731, at concentration as high as 20 nM, was used as radioligand did



not reached saturation (results not shown). As discussed in detail by Kenakin (1997) this difference in the binding results for agonists and antagonists is frequently observed in the studies involving recombinant G protein coupled receptors in which the availability of G proteins is limited.

B2 antagonist, when applied at the top of the calcium transient, accelerated the shut down of the signal. These data suggest that calcium mobilization at this point still is influenced by receptor occupation and that the height and amplitude of the peak could be modified if receptor desensitization were prevented. In this situation, the increased response to Bk in the presence of genistein, even during the first challenge with the agonist, could be explained by a possible participation of tyrosine kinases regulating homologous receptor desensitization. The effect of genistein-sensitive tyrosine kinase(s) could also be attributed to a component of the signal transduction pathway downstream of the receptor that is not shared with octopamine or non receptor-activated calcium mobilization by thapsigargin. Our experiments, in which the effect of genistein on calcium mobilization was determined in the absence of extracellular calcium, suggest an effect of this inhibitor at two points of the process. One at the level of receptor desensitization, since its effect was only detected in the second challenge with the agonist; and the other at the level of calcium entry, since its effect over the initial stimulation with BK disappeared in the absence of extracellular calcium. In CHO cells expressing mouse B2 receptors, the effect of genistein on calcium mobilization revealed that the activity of tyrosine kinases is required for the sustained phase of the response but does not affect the initial peak of calcium elicited by Bk (Takeo et al., 1997). Differences in the regulatory properties of human and mouse B2 receptors can be involved in the opposite effects observed for the action of genistein in Bk-elicited calcium mobilization in CHO and sf21 cells. Besides, it seems possible that different regulatory mechanisms, acting at the level of effector proteins, are required to maintain the sustained phase of the calcium response in each cell type. A diminished response of B2 and other serpentine receptors in the absence of extracellular calcium has been commonly observed (Harteneck et al., 1995). Furthermore,

inward calcium currents after agonist stimulation are detected by patch-clamp techniques a few milliseconds after agonist application, a time inferior to that required to reach the peak of calcium in the first challenge with the agonist (Vaca and Kunze, 1994). Tyrosine kinase activity is required to sustain inward calcium currents in human foreskin fibroblasts (Lee et al., 1993). No entry of calcium induced by mobilization from intracellular stores was detected in fibroblasts from c-Src knockout mice and the process was recovered by transfection of the tyrosine kinase (Babnigg et al., 1997).

Desensitization is a regulatory mechanism that terminates agonist-induced second messenger cascades for a wide variety of receptors. There is ample experimental evidence indicating that phosphorylation of G protein-coupled receptors is involved in the desensitization mechanism (Alblas et al., 1996; Cyr et al., 1993; Lefkowitz et al., 1993). Serine/threonine kinases such as protein kinase C and GRKs such as the  $\beta$ -adrenergic receptor kinases ( $\beta$ ARK) play important roles in the desensitization and internalization of adrenergic receptors (Lefkowitz et al., 1993). Regulation of B2 receptor activity by ligand-promoted serine and threonine phosphorylation has been demonstrated (Blaukat et al., 1996), and the potential role of protein kinase C in the desensitization of the B2 receptor has been highlighted (Clerk et al., 1996; Luo et al., 1992). Absence of tyrosine phosphorylation of radiolabeled B2 receptor has been recently reported (Blaukat et al., 1996); according to those data, it could be hypothesized that the tyrosine kinase inhibited by genistein produced an indirect effect on the receptor function. This hypothesis is further supported by the fact that phosphoserine and traces of phosphothreonine were the phosphoaminoacids detected by two dimensional thin layer cellulose electrophoresis from acid hydrolyzates of the B2 recombinant receptors isolated from sf21 cells. In this regard, it has been demonstrated that isoforms of PKC (particularly PCK  $\delta$ ) are negatively regulated by phosphorylation (Denning et al., 1996; Zang et al., 1997) and that PKC activity regulates positively the activity of GRK-2 (Chuang et al., 1996, 1995). Effect of phorbol esters on the phosphorylation of neurokinin receptor in Sf9 cells has been reported, suggesting the presence of endogenous PKC isoforms. Besides, members of the

heterotrimeric GTP-binding proteins in these cells have been detected (Nishimura et al., 1998; Leopoldt et al., 1997). However, since tyrosine phosphorylation, detected by anti-phosphotyrosine antibodies, has been reported to occur in B2 receptors endogenously expressed in WI-38 human lung fibroblasts, a direct effect of genistein can not be discarded (Jong et al., 1993). Besides, the presence of phosphotyrosine that remained under the limits of detection of our system can not be discarded. In this respect, it has recently been reported the detection of phosphotyrosine, by mass spectrometric analysis, in intracellular tyrosines from B2 receptors isolated from unstimulated transfected CHO cells (Soskik et al., 1999). Interestingly, these residues correspond to intracellular tyrosines that have been reported as essential for receptor elicited phosphoinositide turnover (Prado et al., 1997).

Mutation of Rat B2 receptor at Tyr131 significantly reduced IP<sub>3</sub> formation and arachidonic acid release in response to Bk, whereas mutation of Tyr321 and Tyr131 had a profound effect on receptor internalization (Prado et al., 1997). Thus, accumulating evidence suggests that stimulation of B2 receptors may induce tyrosine phosphorylation of downstream effectors and in turn that tyrosine phosphorylation may affect B2 receptor signaling by a direct or indirect mechanism. Our data, regarding the ability of genistein to prevent Bk-elicited uncoupling of B2 receptors from G proteins, detected by *in vitro* [<sup>35</sup>S]GTPγS binding to membranes from cells that were stimulated with Bk in the presence of genistein, together with the absence of phosphotyrosine in the phosphoaminoacid analysis, support the alternative of an indirect role for tyrosine phosphorylation on the increased ability of B2 receptors to elicit intracellular calcium mobilization, by an effect at the level of receptor-G protein coupling interface, and on the increased phosphorylation of receptors (mainly at serine residues).

The fact that the genistein effect on intracellular calcium mobilization was observed a few minutes after its application suggests that genistein-reduced receptor desensitization does not involve receptor internalization, which is an event that usually requires several minutes to occur. This is further supported by the results illustrated in figure 3, in which genistein was applied several minutes after

exposing the receptor to two consecutive Bk applications. Even under these conditions, genistein produced a typical increment in the Bk-induced change in  $[Ca^{2+}]_i$ , as compared to control cells, indicating that the receptors were still available in the plasma membrane but they were not fully responsive to Bk (in the absence of tyrosine kinase inhibitors). During the period of time in which the studies on calcium mobilization were performed, no change in the expression of the receptor at the cell surface were detected by indirect immunofluorescence in unpermeabilized cells, suggesting that no major internalization of receptors occurred during this period. To the best of our knowledge, no studies on the ability of sf21 insect cells to support the internalization of B2 receptors have been reported. Since we did not follow the internalization of radioligand bound to receptors, our results regarding the permanence of receptors, detected by immunofluorescence, can also be interpreted on the basis of a rapid receptor recycling that maintains a constant number of receptors on the cell surface. Other G protein coupled receptors whose internalization has been demonstrated in insect cells are the human  $\alpha_2$  adrenergic receptor and the human dopamine D1 receptor, in both examples a 30% of receptor internalization was detected (Kieymann et al., 1993; and Trogadis et al., 1995).

An enigma of the present study is that increased B2 receptor phosphorylation of the B2 receptor comes along with attenuated receptor desensitization. Whereas previous studies have shown that ligand-promoted B2 receptor phosphorylation is causally linked to its desensitization (Blaukat et al., 1996). The distinct possibility, however, remains that in the presence of genistein the B2 receptor is phosphorylated on multiple residues that are not phosphorylated by homologous mechanisms, or that the activity of other proteins, able to influence receptor-G protein coupling can be altered by phosphorylation. In this sense, it has been reported that tyrosine phosphorylation of G $\alpha_q/11$  diminishes its coupling to muscarinic M1 receptors (Humemori et al., 1997). At present time we cannot exclude the possibility that the observed effects are cell type-specific and not a general phenomena also observed in mammalian cells. Our preliminary results with human fibroblasts expressing endogenous B2 receptor or CHO cells expressing

this receptor are also subject to genistein-responsive regulation (data not shown). We anticipate that sf21 insect cells provide a useful system to further explore the mechanisms that modulate receptor activity by tyrosine kinases.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. William P. Schilling for kindly providing the human B2 receptor clone and Dr. J. Adolfo García-Sáinz for critical reading of the manuscript and for allowing us the utilization of some of his equipment. This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) No. IN-209495, from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. 0103-PN, from the Third World Academy of Sciences (TWAS) No. 96-376 to L Vaca and from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to W Müller-Esterl. G Reyes-C is a recipient of a scholarship from DGAPA-UNAM. The services of the Molecular Biology and Microscopy Units of the Cell Physiology Institute of the Autonomous National University of Mexico and the technical assistance of Alicia Samperi is greatly appreciated.

## e) REFERENCES

Abd Alla S, Buschko J, Quitterer U, Maidhof A, Haasemann M, Breipohl G, Knolle J and Müller-Esterl W (1993): Structural features of the human bradykinin B2 receptor probed by agonists, antagonists, and anti-idiotypic antibodies. *J Biol Chem* 268:17277- 17285.

Abd Alla S, Quitterer U, Grigoriev S, Maidhof A, Haasemann M, Jarnagin K, and Müller-Esterl W (1996): Extracellular domains of the bradykinin B2 receptor involved in ligand binding and agonist sensing defined by anti-peptide antibodies. *J Biol Chem* 271:1748- 1755.

Alblas J, Etten IV, Moolenaar WH (1996): Truncated desensitization-defective neurokinin receptors mediate sustained MAP kinase activation, cell growth and transformation by a Ras-independent mechanism. *EMBO Journal* 15:3351- 3360.

Alblas J, Etten I van, Khanum A, Moolenaar WH (1995): C-terminal truncation of the neurokinin-2 receptor causes enhanced and sustained agonist-induced signaling. Role of receptor phosphorylation in signal attenuation. *J Biol Chem* 270(15):8944-51.

Baenziger NL, Jong YJ, Yocum SA, Dalemar RL, Wilhelm B, Vavrek R, Stewart JM (1992): Diversity of B2 bradykinin receptors with nanomolar affinity expressed in passaged IMR90 human lung fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 58:71-80.

Babnigg G, Bowersox SR, Villereal ML (1997): The role of pp60 c-src in the regulation of calcium entry via store-operated calcium channels. *J Biol Chem* 272(47):29434-7.

Barr AJ, Brass LF, Manning DR (1997): Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor G protein coupling. *J Biol Chem* 272(4):2223-94.

Beukers MW, Klaassen CH, De Grip WJ, Verzijl, Timmerman H, Leurs R (1997): Heterologous expression of rat epitope-tagged histamine H2 receptors in insect Sf9 cells. *Br J Pharmacol* 122(5):867-74.

Blaukat A, Alla SA, LohseMJ, Müller-Esterl W (1996): Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor

from human fibroblasts. *J Biol Chem* 271:32366-32374.

Boyle WJ, van der Geer P, Hunter T (1991). Phosphopeptide mapping and phosphoaminoacid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol* 201:110-149.

Cauzabon S, Parker PJ, Strosberg AD, Couraud PO (1993): Endothelins stimulate tyrosine phosphorylation and activity of p42/mitogen-activated protein kinase in astrocytes. *Biochem J* 293:381-386.

Chen X, Earley K, Luo W, Lin SH, Schilling WP1 (1996): Functional expression of a human thrombin receptor in Sf9 insect cells, evidence for an active tethered ligand. *Biochem J* 314 (Pt 2): 603-11.

Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, De Blasi A (1996): G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci* 17(11):416-21.

Chuang TT, LeVine H III, De Blasi A (1995): Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem* (31):18660-5.

Clerk A, Gillespie-Brown J, Fuller SJ, Sugden PH (1996): Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, protein kinase C translocation, and mitogen-activated protein kinase activity by bradykinin in rat ventricular myocytes: dissociation from the hypertrophic response. *Biochem J* 317:109-118.

Cyr CR, Rudy B., Kris RM (1993): Prolonged desensitization of the human endothelin A receptor in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 268:26071-26074.

Dalemar LR, Jong YJi, Wilhelm B, Baenziger NL (1996): Protein kinases A and C rapidly modulate expression of human fibroblast B2 bradykinin receptor affinity forms. *Eur J Cell Biol* 69:236-244.

De Weerd WFC, Leeb-Lundberg LMF (1997): Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled G $\alpha$  subunits G $\alpha_q$  and G $\alpha_i$  in caveolae in DDT<sub>1</sub> MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272:17858-17866.

Denning MF, Dlugosz AA, Threadgill DW, Magnuson T, Yuspa SH (1996): Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction

pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J Biol Chem* 271(10):5325-31.

Dong Y, Kunze DL, Vaca L, Schilling WP (1995): Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> activates *Drosophila* cation channel Trp1 in recombinant baculovirus-infected Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 269(5 Pt 1):C1332-9.

Falcone RC, Hubbs SJ, Vanderloo JD, Prosser JC, Little J, Gomes G, Aharony D, Krell RD (1993): Characterization of bradykinin receptors in guinea pig gall bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1291-1299.

Fukushima Y, Asano T, Saitoh T, Anai M, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Matsushashi N, Yazaki Y, Sugano K (1997): Oligomer formation of histamine H<sub>2</sub> receptors expressed in Sf9 and COS-7 cells. *FEBS Lett* 409(2):283-6.

Grynkiewicz, G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem* 260:3440-3450.

Hall JM (1992): Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *J Pharmac Ther* 56:131-190.

Harteneck C, Obukhov AG, Zobel A, Kalkbrenner F, Schultz G (1995): The *Drosophila* cation channel trp1 expressed in insect Sf9 cells is stimulated by agonists of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett* 358(3):297-300.

Hasler WL, Kurosawa S, Takahashi T, Feng H, Gaginella TS, Owyang C (1995): Bradykinin acting on B<sub>2</sub> receptors contracts colon circular muscle cells by IP<sub>3</sub> generation and adenylate cyclase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 273(1):344-350.

Hu Y, Rajan L, Schilling WP (1994): Ca<sup>2+</sup> signaling in Sf9 insect cells and the functional expression of a rat brain M<sub>5</sub> muscarinic receptor. *Am J Physiol* 266(6 Pt1):C1736-43.

Humemori H, Inoue T, Kume S, Sekiyama N, Nagao M, Itoh H, Nakanishi S, Mikoshiba K, Yamamoto T (1997): Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the  $\alpha$  subunit. *Science* 276:1878-1881.

Jong YJ, Dalemar LR, Wilhelm B, Baezinger NL (1993): Human bradykinin B<sub>2</sub> receptors isolated by receptor-specific monoclonal antibodies are



tyrosine phosphorylated. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10994-10998.

Kenakin T (1997): Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. *Trends Pharmacol Sci* 12:456-464.

Kleymann G, Boege F, Hahn M, Hampe W, Vasudevan S, Reilander H (1993): Human beta 2-adrenergic receptor produced in stably transformed insect cells is functionally coupled via endogenous GTP-binding protein to adenylyl cyclase. *Eur J Biochem* 213(2):797-804.

Kukkonen JP, Nasman J, Rinken A, Dementjev A, Akerman KE (1998): Pseudo-noncompetitive antagonism of M1, M3, and M5 muscarinic receptor-mediated  $Ca^{2+}$  mobilization by muscarinic antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 243(1):41-6.

Kukkonen JP, Nasman J, Ojala P, Oker-Blom C, Akerman KE (1996): Functional properties of muscarinic receptor subtypes Hm1, Hm3 and Hm5 expressed in Sf9 cells using the baculovirus expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 279(2):593-601.

Kunze DL, Sinkins WG, Vaca L, Schilling WP (1997): Properties of single *Drosophila* Trp1 channels expressed in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 272(1 Pt1):C27-34.

Lee Kyung-Mi, and M.L. Villereal (1996): Tyrosine phosphorylation and activation of pp60<sup>c-src</sup> and pp60<sup>FAK</sup> in bradykinin-stimulated fibroblasts. *Am J Physiol* 270 (Cell Physiol 39): C1430-1437.

Lee KM, Toscas K, Villereal ML (1993): Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced  $Ca^{2+}$  entry by tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* 268(14):9945-8.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Kjelsberg MA, Pflüger J, Koch WJ, Inglesse J, Caron MG (1993): Adrenergic receptors: recent insights into their mechanism of activation and desensitization. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 28:1-9.

Leopoldt D, Harteneck C, Nurnberg B (1997): G proteins endogenously expressed in Sf9 cells: interactions with mammalian histamine receptors. *Naunyn*

Schmiedebergs Arch Pharmacol 356(2):216-24.

Luo H, Lindeman RP, Chase HS Jr (1992): Participation of protein kinase C in desensitization to bradykinin and to carbachol in MDCK cells. Am J Physiol 262(3 Pt 2):F499-506.

Nishimura K, Frederick J, Kwatra MM (1998a): Human substance P receptor expressed in Sf9 cells couples with multiple endogenous G proteins. J Recept Signal Transduct Res 18(1):51-65.

Nishimura K, Warabi K, Roush ED, Frederick J, Schwinn DA, Kwatra MM (1998b): Characterization of GRK2-catalyzed phosphorylation of the human substance P receptor in Sf9 membranes. Biochemistry 37(5):1192-8.

O'Reilly DR, Miller LK and U.A. Luckow (1992): Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. New York: Freeman.

Pizard A, Marchetti J, Allegrini J, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM (1998): Negative cooperativity in the human bradykinin B2 receptor. J Biol Chem 273(3):1309-1315.

Prado GN, Taylor L and Polgar P (1997): Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B2 receptor. J Biol Chem 272:14638-14642.

Regoli D, Gobeli F, NGuyen QT, Jukic D, Seoane PR, Salvino JM, and Sawutz DG (1994): Bradykinin receptor types and B<sub>2</sub> subtypes. Life Sciences 55 (10):735-749.

Regoli D, Jukic D, Gobeli F and Rhaleb NE (1993): Receptor for bradykinin and related kinins: a critical analysis. Can J Physiol Pharmacol 71:556-567.

Richardson RM, Hosey MM (1992): Agonist-induced phosphorylation and desensitization of human m2 muscarinic cholinergic receptors in Sf9 insect cells. J Biol Chem 267(31):22249-55.

Rodriguez-Fernandez JL, Rozengurt E (1996): Bombesin, bradykinin, vasopressin and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. J Biol Chem 271:27895-27901.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): Molecular cloning: A

laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Satoh M, Miyamoto C, Terashima H, Tachibana Y, Wada K, Watanabe T, Hayes AE, Gentz R, Furuichi Y (1997): Human endothelin receptors ET(A) and ET(B) expressed in baculovirus-infected insect cells-direct application for signal transduction analysis. *Eur J Biochem.* 249(3):803-11.

Schroeder C, Beug H, Müller-Esterl W (1997): Cloning and functional characterization of the ornithokinin receptor. Recognition of the major kinin receptor antagonist, HOE140, as a full agonist. *J Biol Chem* 272(19):12475-81.

Sharif NA, Whiting RL (1993): The neuropeptide bradykinin stimulates phosphoinositide turnover in HSDM1C1 cells: B2-antagonist-sensitive responses and receptor binding studies. *Neurochem Res* 18(12):1313-1320.

Soskic V, Nyakatura E, Roos M, Müller-Esterl W, Godovac-Zimmermann J (1999): Correlations in palmitoylation and multiple phosphorylation of rat bradykinin B2 receptor in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 274(13):8539-8545.

Taketo M, Yokoyama S, Kimura Y, Higashida H (1997): Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup> influx in Chinese hamster ovary cells expressing the cloned mouse B2 bradykinin receptor: tyrosine kinase inhibitor-sensitive and -insensitive processes. *Biochim Biophys Acta* 1355(1):89-98.

Trogadis JE, Ng GY, O'Dowd BF, George SR, Stevens JK (1995): Dopamine D1 receptor distribution in Sf9 cells imaged by confocal microscopy: a quantitative evaluation. *J Histochem Cytochem* 43(5):497-506.

Vaca L, Kunze DL (1994): Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores activates a Ca(2+)-selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol* 267(4 Pt1):C920-5.

Vázquez-Prado J, Medina LC and García-Sáinz JA (1997): Activation of endothelin ET<sub>A</sub> receptors induces phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -adrenoreceptors in rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 272:27330-27333.

Wieland T and Jakobs KH (1994): Measurement of receptor-stimulated guanosine 5'-O-( $\gamma$ -thio)triphosphate binding by G proteins. *Methods Enzymol*

237:3-12.

Zang Q, Lu Z, Curio M, Barile N, Shalloway D, Foster DA (1997): Association between v-Src and protein kinase C delta in v-Src-transformed fibroblasts. *J Biol Chem* 272 (20):13275-80.

**FIGURE LEGENDS**

Figure 1, A-B. [ $^3\text{H}$  Bk] saturation binding, Western blotting and surface expression of human B2 receptor in insect sf21 cells. Panel A: [ $^3\text{H}$ ]Bk saturation binding of human B2 receptor expressed in sf21 cells 54 hrs postinfection. Binding was done in membranes from infected cells as described in Methods. A representative curve from three experiments done in triplicate is shown. Scatchard analysis of the plotted data revealed a Kd of 0.66 nM. Panel B: immunoblots of membranes of sf21 cells expressing the human B2 receptor (B2R) and membranes of non infected cells (NI). Ten micrograms of membranes were loaded in each lane, the immunoblots were probed by AS-346 antibody at a 1:1000 dilution. Non infected cells (NI) were used as control. Panel C: Expression of the receptor was examined 48 h postinfection by indirect immunofluorescence staining using an antibody against the second extracellular loop of the receptor (AS 276) and fluorescein-labeled goat anti-rabbit antibody.

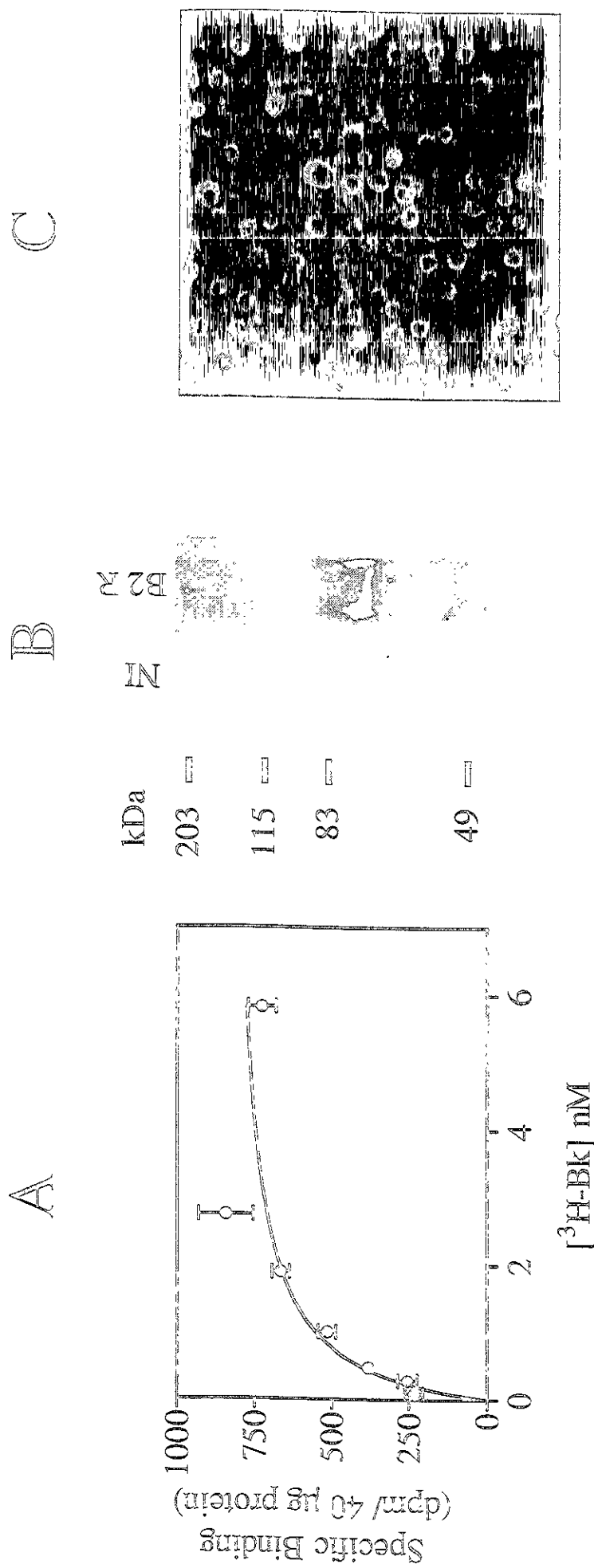
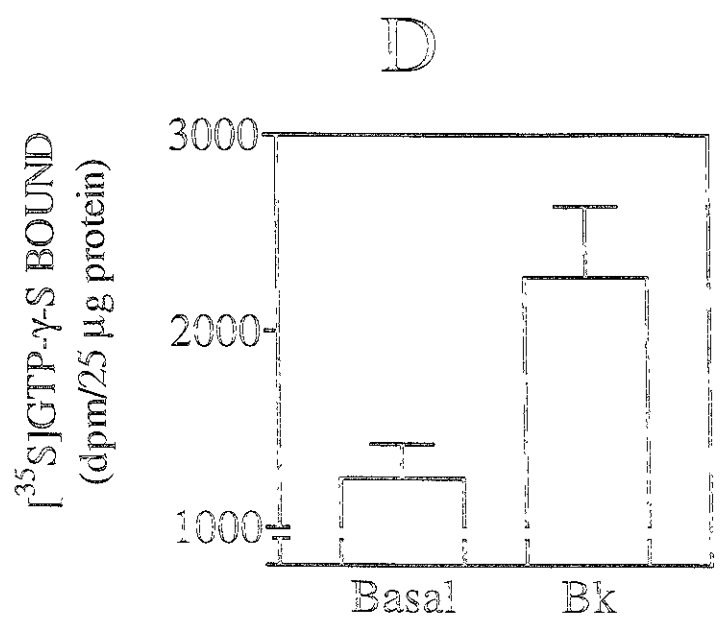
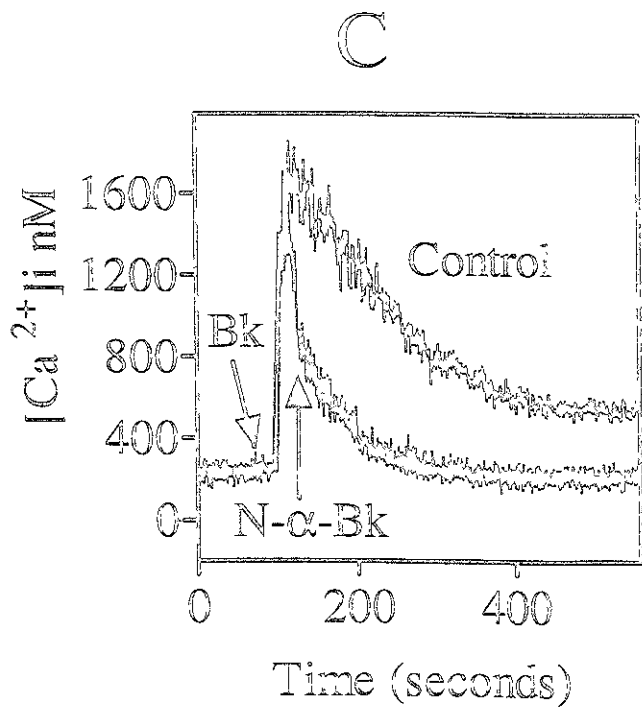
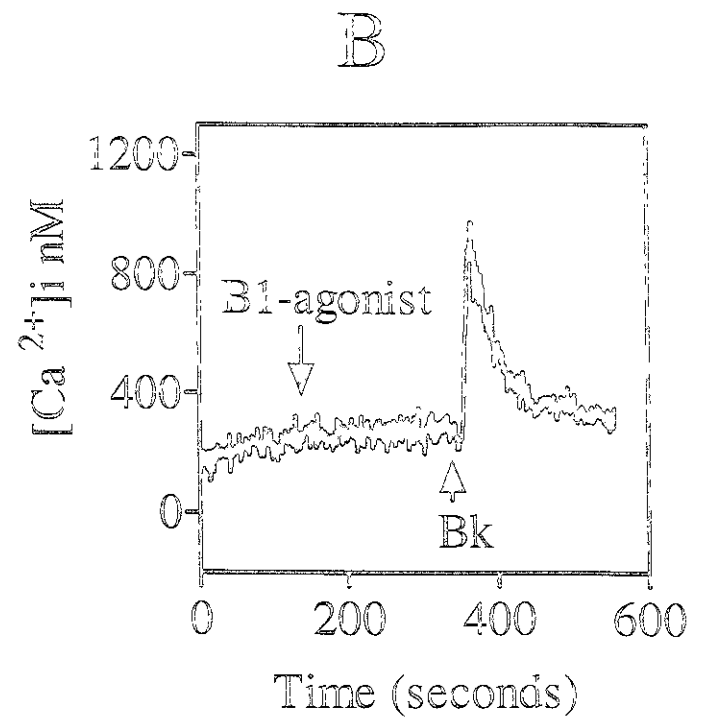
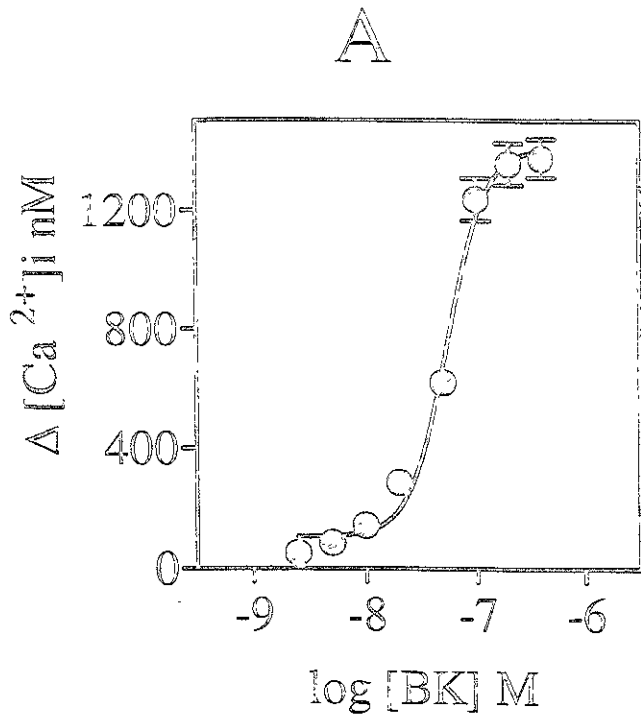


Figure 2, A-C. Functional expression of human B2 receptor in insect *sf21* cells. Panel A: Dose-response curve to bradykinin (Bk) showing the  $[Ca^{2+}]_i$  change induced by increasing concentrations of the agonist. Analysis of the dose response curve revealed an  $EC_{50}$  of 50 nM. Panel B: Effect of 100 nM Bk added after 1  $\mu$ M (Des-Arg<sup>9</sup>)-Bk, a B1 receptor specific agonist. Panel C: Effect of 10  $\mu$ M N- $\alpha$ -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5,8</sup>,D-phe<sup>7</sup>]-Bk (N- $\alpha$ -Bk), a B2 specific antagonist, on the calcium change induced by 100 nM Bk. The antagonist was added at the peak of the Bk response (shown by the vertical arrow). Panel D: Bk-elicited binding of [<sup>35</sup>S]GTP- $\gamma$ -S to membranes from cells expressing the B2 receptor. *In vitro* [<sup>35</sup>S]GTP- $\gamma$ -S binding was performed in the absence of any agent (basal) or in the presence of 1  $\mu$ M bradykinin (Bk). Non-specific binding was subtracted from each value. Values represent the means  $\pm$  standard errors from 7 of independent determinations ( $p < 0.05$ ).





*Figure 3, A-C. Mobilization of  $[Ca^{2+}]_i$ , elicited by consecutive applications of Bk in B2 receptor expressing sf21 cells. Panel A: Typical response in calcium to three consecutive applications of Bk. Transient response induced by 100 nM Bk (first application), 400 nM Bk (second application) and 100 nM Bk (third application). Panel B: Similar protocol to Panel A but Bk was removed from the bath (Wash) before the third application. Panel C: Similar protocol to the previous one, but in this case the cells were exposed to 10  $\mu$ M genistein (Wash + Gen) before the third stimulation with Bk. The time interval during wash was 15 min. The pause before the third application in panels B and C is indicated by a gap in the curve*

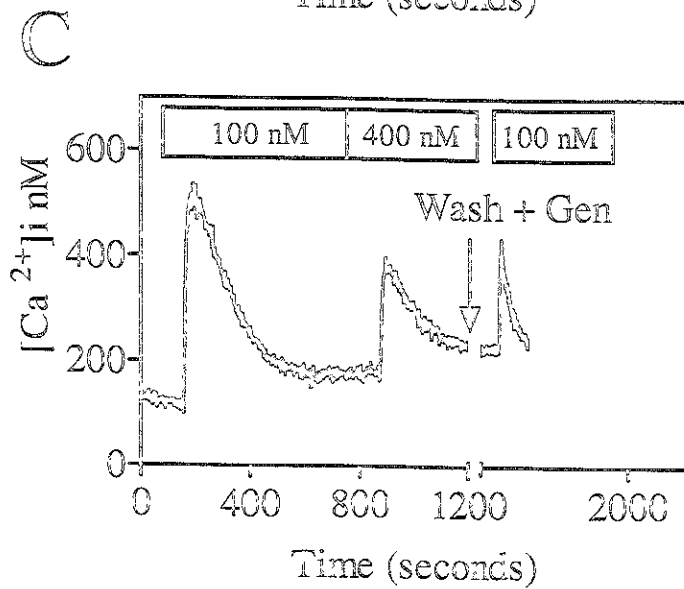
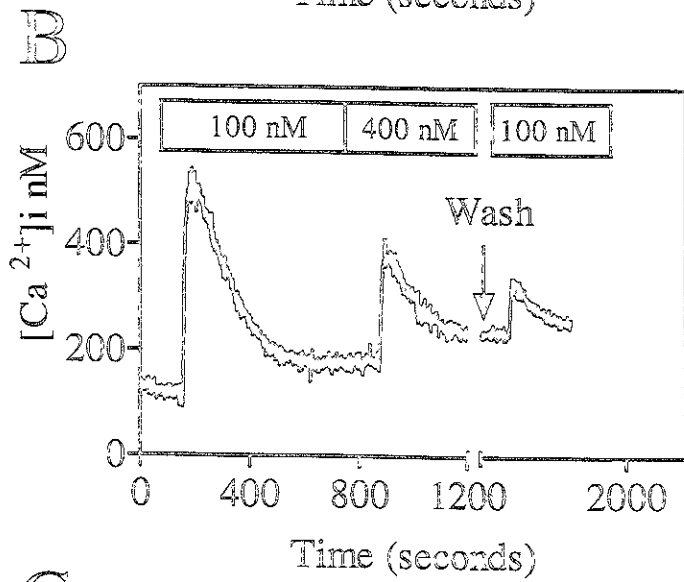
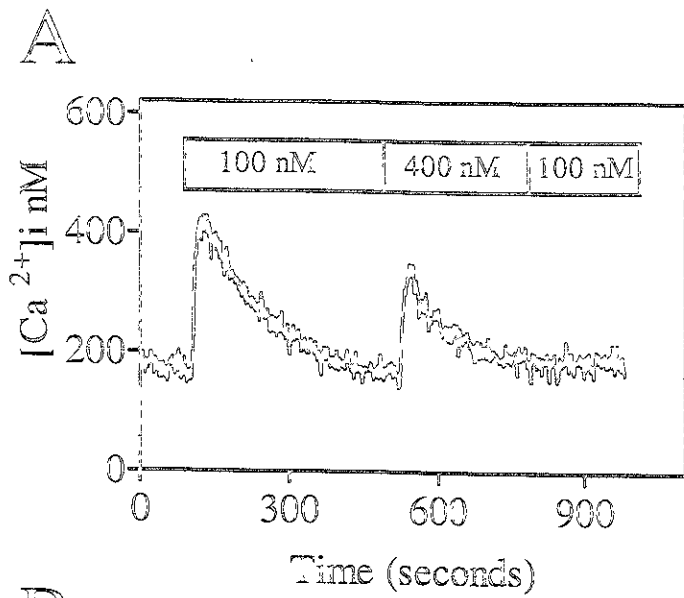


Figure 4, A-C. Effect of genistein on the mobilization of  $[Ca^{2+}]_i$  elicited by consecutive Bk applications in B2 receptor expressing sf21 cells. Panel A: Representative experiment illustrating the desensitization of the Bk receptor after agonist stimulation. The cells were exposed to 100 and 400 nM Bk. After this, the cells were stimulated with 500  $\mu$ M octopamine (OC 500). Panel B: Effect of 10  $\mu$ M genistein, preincubated for 10 min, in the response to 100 and 400 nM Bk and 500  $\mu$ M octopamine (OC 500). The boxes indicate the time of application for each agonist. Panel C: Change in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by the first (100 nM) and second (400 nM) Bk applications in genistein-treated and control cells in the presence of extracellular calcium (1.8 mM  $Ca^{2+}$ ),  $p < 0.05$  for the effect of both Bk applications in the presence of genistein compared to control cells. Panel D: Change in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by the first (100 nM) and second (400 nM) Bk applications in genistein-treated cells in the presence of 5 mM EGTA (Low  $Ca^{2+}$ ),  $p < 0.05$  for the effect of 400 nM Bk in genistein-treated cells compared to control. Values represent the means  $\pm$  standard errors from six independent determinations.

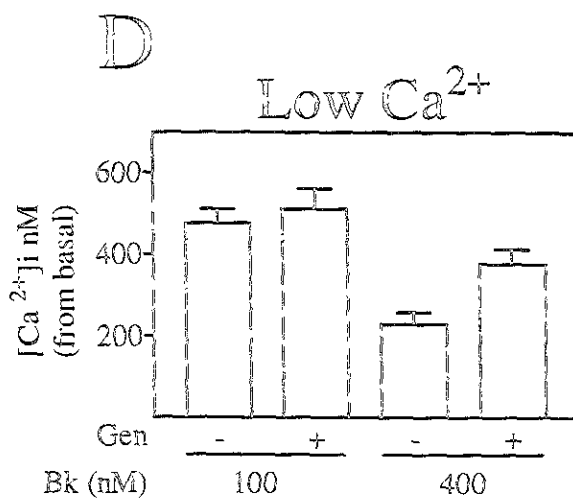
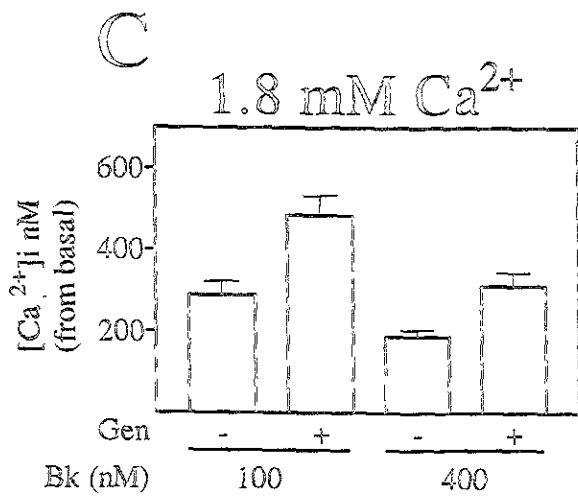
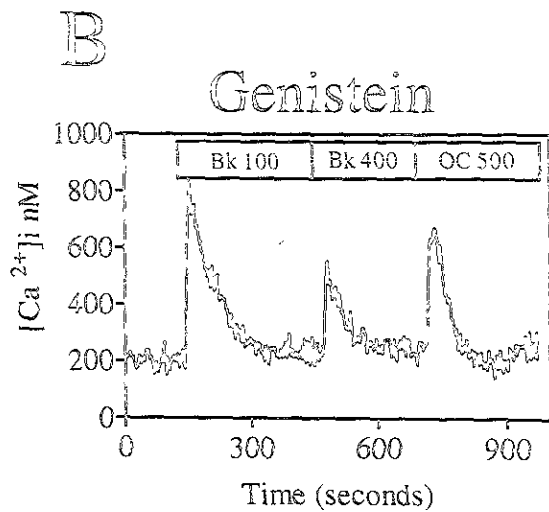
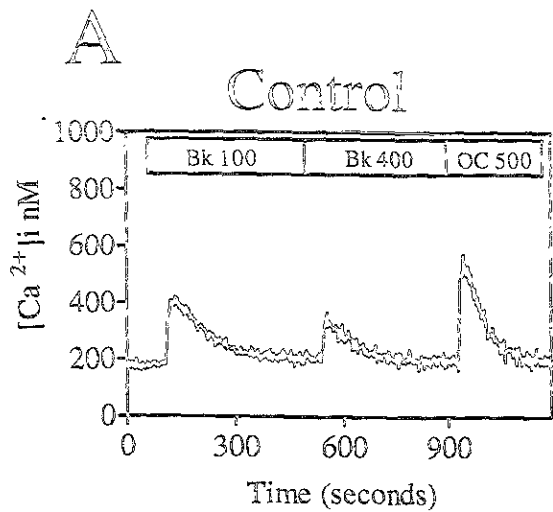
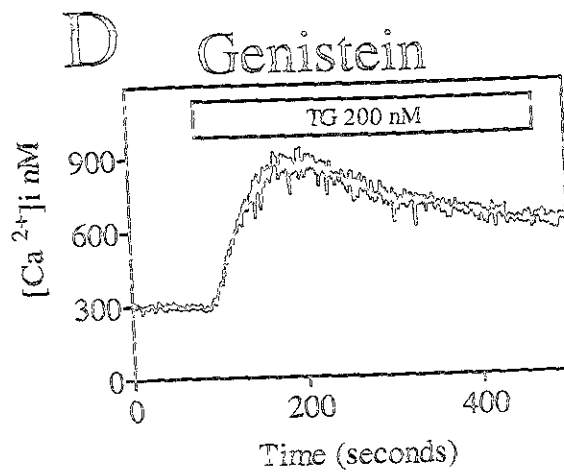
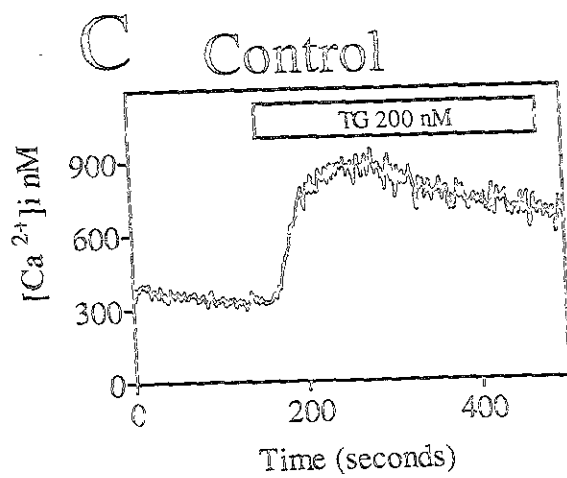
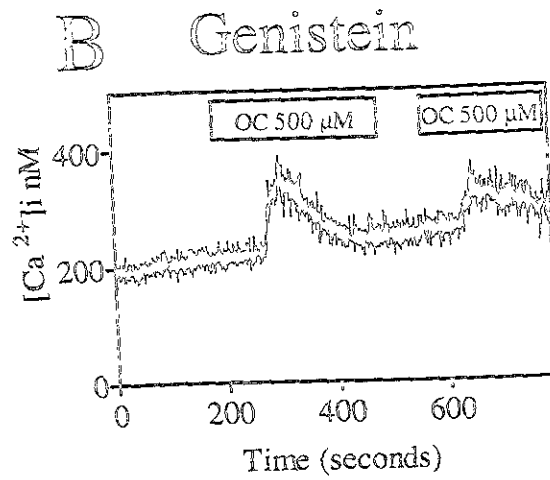
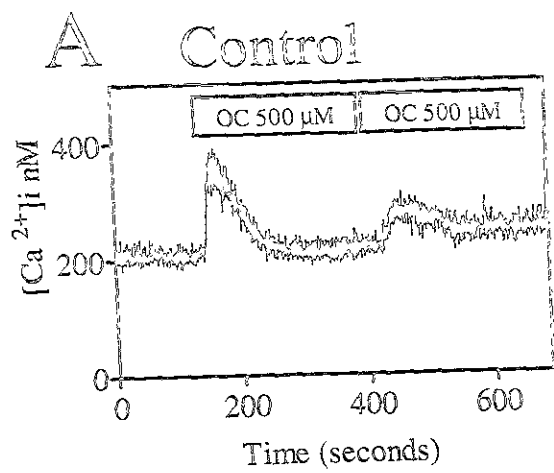
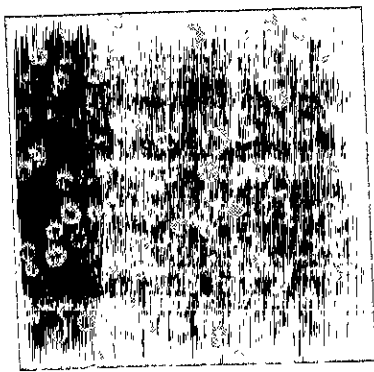


Figure 5, A-D. Effect of genistein on octopamine- or thapsigargin-induced calcium responses in sf21 cells expressing B2 receptors. Panel A: Representative trace of the change in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by two consecutive applications of 500  $\mu$ M octopamine (first and second peaks). Panel B: Representative trace of the change in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by two consecutive applications of 500  $\mu$ M octopamine in cells incubated with 10  $\mu$ M genistein for 10 minutes. Panel C: Representative trace of the change in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 200 nM thapsigargin (TG) in control cells and Panel D shows change in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 200 nM thapsigargin (TG) in cells treated with 10  $\mu$ M genistein. Values represent the means  $\pm$  standard errors (SE) from the number of independent observations. ( $p = 0.36$  for TG and  $p = 0.94$  and  $p = 0.82$  for the first and second octopamine applications, comparing the respective peaks in control and genistein-treated cells).

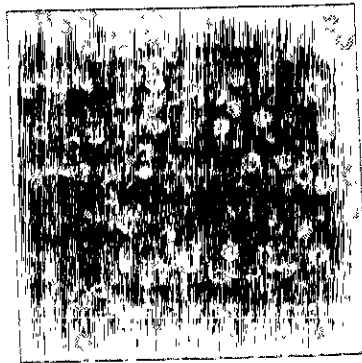
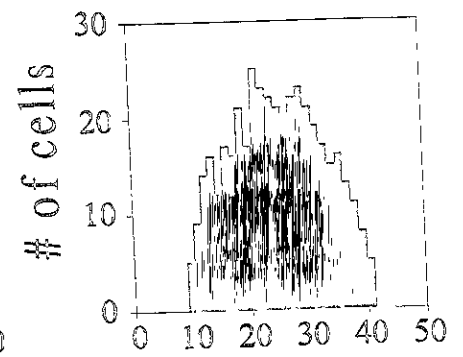
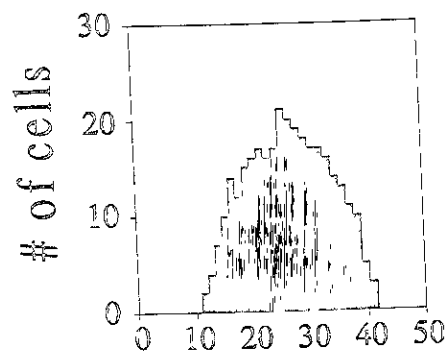
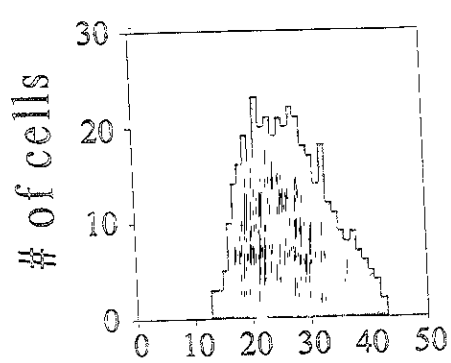
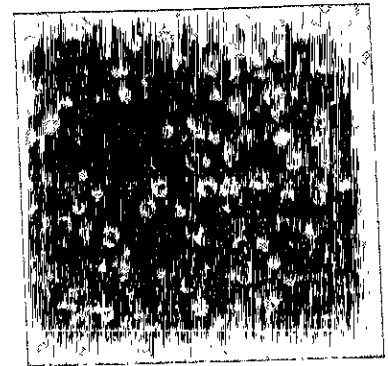


*Figure 6 Effect of Bk and genistein on the surface localization of B2 receptors visualized by confocal microscopy in sf21 cells. B2 expressing sf21 cells were grown on glass coverslips and left untreated (Basal) or treated with 100 nM bradykinin (Bk) or 10  $\mu$ M genistein followed by BK stimulus, (Gen  $\rightarrow$  Bk). indirect immunofluorescence was performed with an antibody against the second extracellular loop of the receptor as described on methods (Upper Panel). The Bottom panel shows the intensity of fluorescence for each treatment. The ordinate specifies the cell number, and the abscissa gives the relative fluorescence intensity.*

Basal



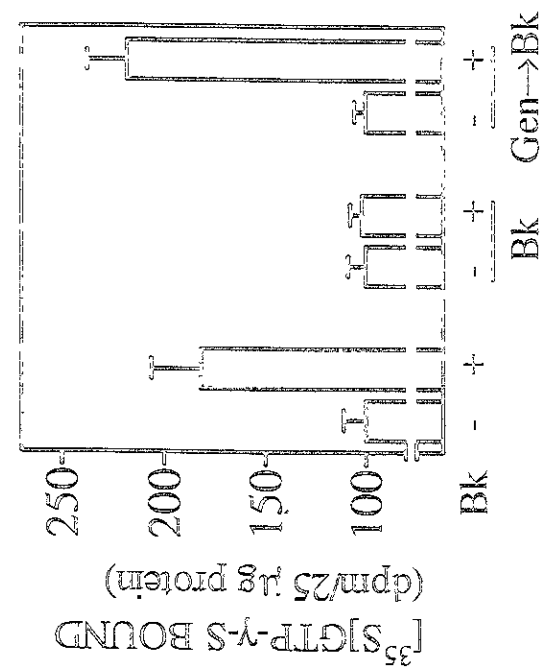
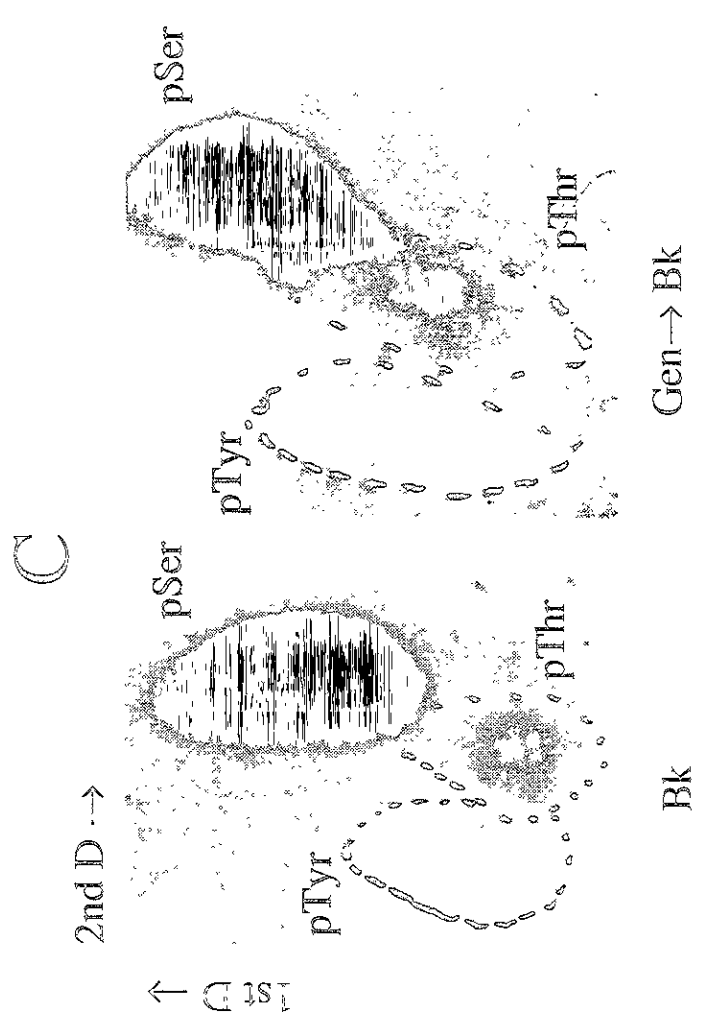
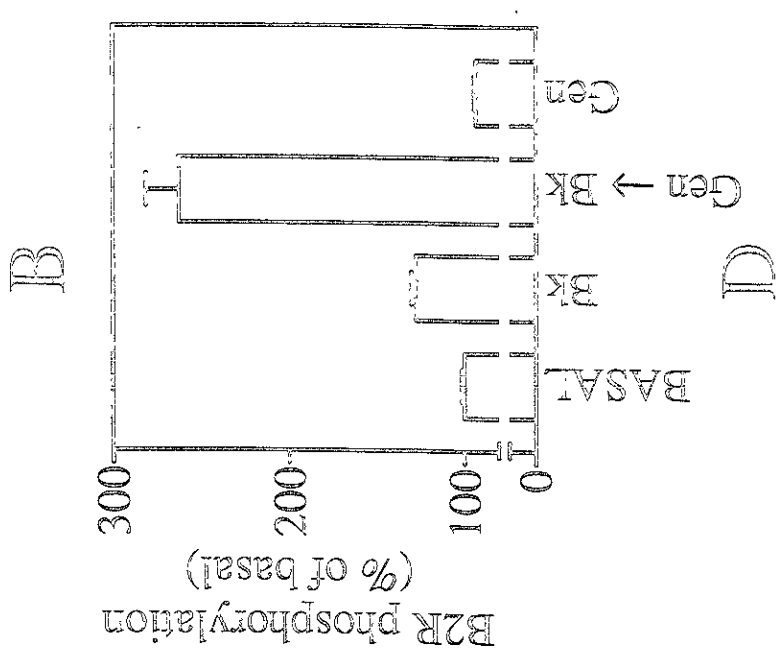
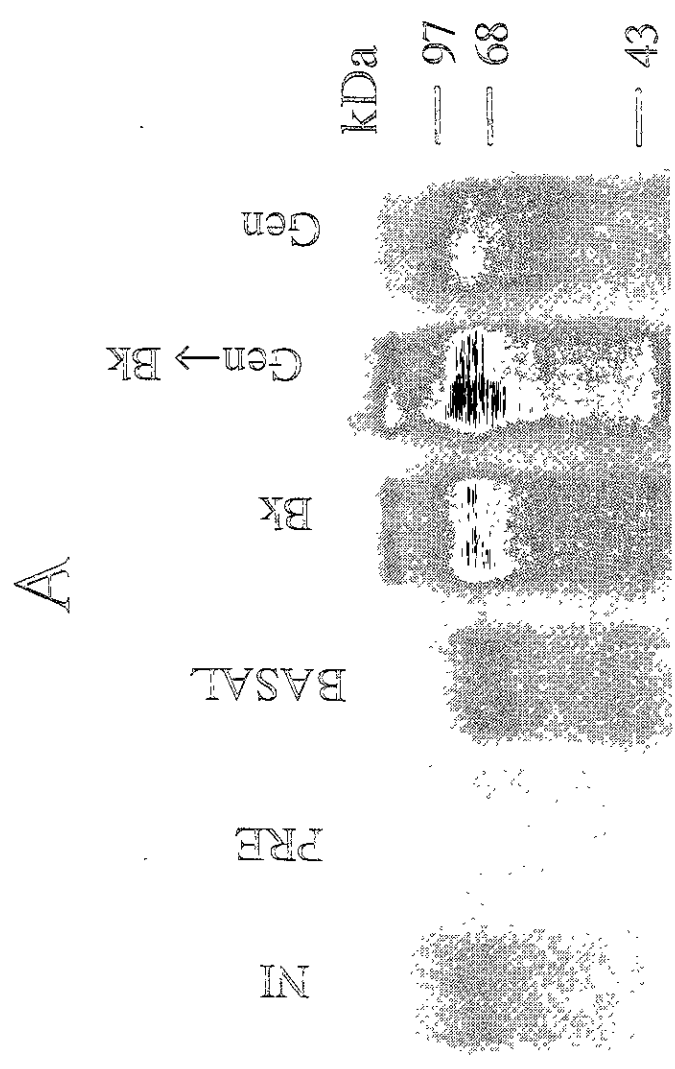
Bk

Gen  $\rightarrow$  Bk

Fluorescence intensity (arbitrary units)



Figure 7, A-B. Effect of Bk and genistein on the phosphorylation and G protein coupling of B2 receptor in sf21 cells. Panel A: Sf21 cells expressing the human B2 receptor were radiolabeled with [ $^{32}$ P]-orthophosphate and incubated with vehicle (basal), 1  $\mu$ M bradykinin (Bk), 10  $\mu$ M genistein for 10 minutes followed by 1  $\mu$ M Bk (Bk  $\rightarrow$  Gen) or 10  $\mu$ M genistein (Gen). Immunoprecipitations were performed with an antibody against the carboxi-terminal region of the receptor as mentioned in methods, or with preimmune serum as control (PRE). NI refers to non infected cells in which the anti-B2 antibody was used. A representative autoradiograph of immunoprecipitated B2 is shown. Pre-stained molecular weight markers are indicated at the right. Panel B: Means  $\pm$  SE of percentage change in phosphorylation over the basal level of B2 receptor expressed in sf21 cells ( $p < 0.05$ , for comparison of Bk and Gen  $\rightarrow$  Bk versus Basal and between them,  $n = 6$ ). Data were obtained from densitometric analysis of the autoradiographies of immunoprecipitated phosphorylated receptors. Panel C: Phosphoaminoacid analysis of hydrolyzates from phosphorylated B2 receptors analyzed by two dimensional thin layer cellulose electrophoresis. A representative autoradiograph showing the results obtained for receptors from cells stimulated with Bk in the presence or absence of Genistein, as described in panel A, is shown. The electrophoretic migration of cold phosphoaminoacids used as standards is indicated. The experiment was repeated once with similar results. Panel D: *In vitro* Bk-stimulated [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding to membranes from cells preincubated with Bk in the presence or absence of Genistein. Sf21 cells expressing B2 receptors were incubated without any agent or with Bk in the presence or absence of Genistein as indicated below each pair of bars. Preincubation of cells with Genistein (10  $\mu$ M) was for 10 min followed by agonist (100 nM Bk for 10 min then 400 nM Bk 10 min). *In vitro* [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding to membranes was performed in the absence of any agent (-) or presence of 1  $\mu$ M Bk as indicated in methods. Plotted are the means  $\pm$  SEM of 10 determinations using membranes obtained from 2 different cultures. Results obtained from cells preincubated with Genistein in the absence of Bk were similar to those represented for the first pair of bars. ( $p < 0.05$  for the *in vitro* effect of Bk in the first and third pair of bars respect to their basal).



## XVII. DISCUSION:

La bradicinina es un péptido que se genera en situaciones de daño tisular agudo y regula respuestas fisiológicas, como inflamación, vasodilatación y algunas derivadas de estímulos dolorosos. El estudio de las acciones de esta, y otras hormonas, se ve limitado por el bajo número de receptores expresados en células silvestres. Sin embargo, resulta evidente la necesidad de contar con los conocimientos básicos relacionados con las acciones celulares de la bradicinina, como sustento para el desarrollo de compuestos reguladores de la actividad de sus receptores, mismos que podrían contribuir al manejo terapéutico del dolor, la inflamación y el tono vascular. Es deseable, pues, el establecimiento de modelos celulares en los que se pueda estudiar la actividad de los receptores para bradicinina y en los que se pueda probar la acción de agentes farmacológicos como reguladores de dicha actividad. En este trabajo queda demostrado que la activación y la regulación de los receptores para bradicinina tipo B2 humanos puede ser estudiada en las células sf21 de insecto. Los receptores para bradicinina B2 recombinantes, expresados en estas células, mostraron características farmacológicas similares a las de los receptores expresados endógenamente en fibroblastos [Hall, 1992]. Además, los receptores B2 se acoplaron a los sistemas transduccionales propios de las células sf21; al igual que en aquellas células que expresan endógenamente a los receptores B2, en las células sf21 estos se acoplaron a la vía de recambio de fosfoinosítidos-calcio y se vieron sujetos al proceso de desensibilización homóloga ante estímulos repetidos con la bradicinina. Un hallazgo interesantemente, fue el encontrar que la actividad de los receptores B2 estuvo sujeta a la acción reguladora de cinasas con especificidad por residuos de tirosina. Aparentemente este efecto ocurrió de forma indirecta ya que el análisis de fosfoaminoácidos de los receptores inmunoprecipitados reveló la presencia de fosfoserina y trazas de fosfotreonina, pero no fosfotirosina.

La expresión de receptores acoplados a proteínas G en células sf21 y sf9 de insecto, utilizando el sistema de baculovirus, ha sido muy útil para entender las implicaciones estructurales y funcionales de estos receptores. El

empleo del sistema de baculovirus provee beneficios tales como: la obtención de niveles elevados de proteína recombinante; la expresión de la proteína recombinante en todas las células infectadas con el baculovirus, a diferencia de métodos convencionales de transfección temporal donde rara vez se logran eficiencias mayores al 50-60%; la obtención de virus recombinantes es metodológicamente sencilla. Cabe destacar que los niveles de expresión, adecuados para el estudio en cuestión, pueden determinarse experimentalmente a distintos tiempos postinfección. Comúnmente las células sf9 y sf21 carecen de receptores endógenos del mismo tipo que se pretende estudiar. Adicionalmente, el empleo de más de un vector permite "reconstituir" *in vitro* sistemas de transducción. Estudios de este tipo han permitido diseccionar el acoplamiento entre receptores y distintas proteínas G [Grünewald et al, 1996; Kozasa and Gilman, 1995], además han servido para que en preparaciones membranales, ricas en receptores recombinantes, se investigue la disponibilidad de estos para servir como sustratos de distintas cinasas, particularmente GRKs y cinasas activadas por segundos mensajeros (PKA y PKC) [Pei, 1994; Haga et al, 1996]. Así mismo, las células de insecto disponen de proteínas G que se acoplan a los receptores expresados heterológicamente [Loisel, 1997; Cramer, 1997; Pei, 1994; Chen, 1995]. Otra ventaja de que los receptores se expresen en una forma funcional es que resulta un sistema idóneo para estudiar las propiedades de unión a diversos ligandos de interés farmacológico.

La regulación de la homeostasis de calcio y la función de los receptores para octopamina, endotelina, trombina, dopamina y muscarínicos m1, m3 y m5, ha sido estudiada en el sistema de células de insecto infectadas con baculovirus. Estos receptores se acoplan a la vía de transducción de recambio de fosfoinosítidos calcio y su comportamiento, tanto funcional como farmacológico, es similar al que manifiestan en las células donde se expresan endógenamente [Beukers et al, 1997; Gentz y Furuichi, 1997; Nishimura et al, 1998; Hu, et al, 1994]. Los receptores para dopamina, expresados en células sf21, han sido objeto de estudios donde se ha descrito la desensibilización, la palmitoilación y la internalización de estos receptores [YK. Ng, 1994; 1995]. Por otra parte,

experimentos de fosforilación *in vitro*, en membranas ricas en receptores recombinantes, han mostrado que los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos y muscarínicos m2, expresados en células sf21, son buenos sustratos para la fosforilación catalizada por la GRK2 [Pei, 1994; Haga *et al*, 1996].

En nuestro estudio, los receptores para bradicinina B2 expresados en las células sf21 muestran afinidad alta por la [ $^3$ H]-Bk (Kd 0.66 nM) determinada por análisis de unión de este ligando radiactivo a membranas de células infectadas, detectándose niveles de 2.57 picomoles de receptor por miligramo de proteína membranar, entre 45 y 54 h post-infección. Esta afinidad resulta comparable con la detectada regularmente en preparaciones de células que expresan endógenamente a estos receptores. Por otro lado, la eficiencia de los receptores para estimular la movilización de calcio intracelular (EC<sub>50</sub> 50 nM) fue relativamente baja comparada con la mayoría de células que expresan naturalmente a estos receptores. Es frecuente encontrar una estrecha correlación entre la afinidad por el ligando (determinada por unión de ligandos radiactivos a preparaciones membranales) y la eficiencia de los receptores para acoplarse a los sistemas transduccionales. Sin embargo, varios tipos celulares muestran características de afinidad por el ligando en el orden subnanomolar y eficiencia en el orden nanomolar. Tal situación ha sido detectada en estudios del recambio de fosfoinosítidos, dependiente de la presencia de bradicinina, en células provenientes de vejiga de hamster y fibrosarcoma murino, entre otros [Falcone *et al*, 1993; Sharif y Whiting, 1993]. Por otro lado, se ha descrito la existencia de heterogeneidad en los receptores para bradicinina manifestada por diferencias importantes en la afinidad de los mismos [Dalemar *et al*, 1998]. Así mismo, estudios recientes de Pizaró y colaboradores (1998) han sugerido la posibilidad de que interacciones directas entre los receptores modulen negativamente la afinidad de los mismos; en tal situación, una mayor expresión de los receptores favorecería una disminución en su afinidad por la bradicinina. Por otro lado, el contenido de proteínas G, que como se sabe regulan la afinidad de los receptores a los que se acoplan, puede ser limitante en sistemas transfectados y, como discute en detalle Kenakin (1997), resultar en eficiencias

disminuidas de acoplamiento de receptores recombinantes a sistemas transduccionales endógenos.

La desensibilización es un mecanismo regulador que termina la cascada de segundos mensajeros inducida por el agonista. La fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G ha sido considerada un evento crucial en este mecanismo. La desensibilización homóloga rápida observada en el receptor tipo B2 para bradicinina juega un papel importante en la terminación de la señal inducida por la hormona, en casos donde el agonista persiste en el medio extracelular o cuando las células son estimuladas repetidamente. En nuestro estudio, la actividad de los receptores B2 fue modulada positivamente por el tratamiento con genisteína y tirfostina, ambos inhibidores con especificidad por cinasas de residuos de tirosina. La aplicación de un antagonista B2 en el punto máximo de la respuesta intracelular aceleró la recuperación de la concentración citoplásmica de calcio libre basal (es decir "la caída" de la respuesta). Estos datos sugieren que la movilización del calcio en este punto todavía es influenciada por la ocupación del receptor por el agonista y que la amplitud y la altura del pico pudiera ser modificado si se previniera la desensibilización. En esta situación, el incremento de la respuesta a bradicinina en presencia de genisteína, aún durante el primer estímulo hormonal, pudiera explicarse por la participación de una cinasa de tirosina que regula la desensibilización homóloga del receptor para bradicinina. Sin embargo, la desensibilización se define como una disminución en la respuesta a aplicaciones repetidas del agonista, de tal manera que el aumento en el primer pico de liberación de calcio causado por la activación de los receptores para bradicinina, en células preincubadas con genisteína, puede explicarse como un efecto que aumenta la sensibilidad del receptor. El efecto de las cinasas de tirosina, sensibles a genisteína, puede atribuirse a un componente que no es compartido con los receptores para octopamina ni con los componentes que participan en la movilización de calcio inducida por taspigargina (un inhibidor de la ATPasa responsable de la recaptura de calcio hacia el retículo endoplásmico). La regulación de la actividad del receptor B2 por fosforilación en serina/treonina ha sido estudiada por el grupo de

Müller-Esterl [Alblas *et al*, 1996], los hallazgos experimentales recientes han sugerido la participación de la GRK-2 y de la PKC en la desensibilización de los receptores B2 [Clerk *et al*, 1996; Luo *et al*, 1993; Alblas *et al*, 1996]. Hasta ahora, el nuestro es el primer estudio que aborda la participación de cinasas con especificidad por residuos de tirosina como reguladores de los receptores B2 para bradicinina.

En el presente trabajo, encontramos un incremento en la fosforilación del receptor cuando las células fueron pretratadas con genisteína, este efecto, por demás sorprendente, fue dependiente de la activación del receptor, sugiriendo que la bradicinina puede promover la activación de cinasas de tirosina que, además de regular acciones celulares posteriores, permiten modular la respuesta de los receptores, particularmente a nivel de su fosforilación y acoplamiento a las proteínas G heterotriméricas. Originalmente se consideraba que las vías de activación de la fosfolipasa C $\beta$  y de distintas cinasas de tirosina estaban controladas independientemente. Sin embargo, existen evidencias que indican que los receptores para bradicinina, neurocinina, endotelina, bombesina y vasopresina pueden acoplarse a ambas vías. [Rodríguez-Fernández, 1996; Alblas, 1996; Countant, 1995; Dikic, 1996; Leeb-Lundberg, 1993, 1994; Tippmer, 1996]. En los fibroblastos de la línea 3T3, la bradicinina induce la fosforilación, en residuos de tirosina, de proteínas como la paxilina y la FAK<sup>p125</sup> [Leeb-Lundberg, 1994], así como la fosforilación de receptores para factor de crecimiento epidérmico (EGF) en queratinocitos humanos [Countant, 1995]. En células PC12 se ha demostrado que la bradicinina activa la vía de la cinasa que responde a mitógenos (MAPK) a través de la cinasa Src [Dikic, 1996].

El hecho de que la fosforilación de los receptores B2 ocurriera principalmente en residuos de serina y ligeramente en treonina sugiere que la genisteína induce un efecto indirecto en la función del receptor. Así pues, tratando de hacer un modelo basado en eventos de regulación de cinasas demostrados en diversos modelos celulares, se podría decir que la fosforilación de los receptores para bradicinina B2, modulada por inhibidores de cinasas de tirosina, pudiera estar mediada por la PKC $\delta$  (o alguna otra cinasa de serina y

treonina regulada por fosforilaciones en tirosina); ya que por un lado, se sabe que esta enzima sufre fosforilación en residuos de tirosina por efecto de la cinasa de tirosina Src y que esta fosforilación resulta en una disminución de la actividad de la PKC $\delta$  [Denning *et al*, 1996; Haleem-Smith *et al*, 1996]. Así, al inhibir con genisteína a una cinasa del tipo de Src, no ocurriría inhibición en la actividad de la PKC $\delta$  y por lo tanto la fosforilación de sus sustratos, en este caso el receptor B2, se vería incrementada en residuos de serina y treonina sobre los que muestra especificidad la PKC. Este modelo coincide con los datos que demuestran que la bradicinina provoca un incremento en la activación de la cinasa de tirosina Src [Rodríguez-Fernández, 1996]. Aunque desde luego no podemos descartar que la presencia de fosfotirosina haya permanecido por debajo de los límites de detección de nuestro análisis de fosfoaminoácidos. En este sentido, el grupo de Müller-Esterl (Blaukat, 1997) que había demostrado la fosforilación de los receptores B2 en residuos de serina y treonina, contribuyó a la determinación reciente de la fosforilación de este receptor en residuos de tirosina, detectados por técnicas de espectrofotometría de absorción atómica (Pizard, 1999), desde luego más sensibles que el análisis de fosfoaminoácidos tradicional que involucra la hidrólisis ácida de las proteínas y que, se sabe, resulta menos sensible para la detección de fosfotirosinas, ya que este residuo es el más susceptible a desaparecer durante el procedimiento de la hidrólisis [Kamps, 1991].

Por otra parte, una alternativa posible es que la inhibición de cinasas de tirosina, por efecto de la genisteína, pueda prevenir la fosforilación del receptor en residuos de tirosina haciendo más sensible al receptor para fosforilarse por cinasas con especificidad por serina/treonina del tipo GRK. Esto se apoya en observaciones del grupo de Müller-Esterl que demostró que la fosforilación del receptor estaba mediada por una cinasa del tipo GRK [Blaukat, 1996]. Como se mencionó, un estudio reciente en el que se vió involucrado este mismo grupo, demostró, por análisis de espectrofotometría de masas, que el receptor para bradicinina está fosforilado en los residuos de tirosina Tyr<sup>161</sup> y Tyr<sup>352</sup>, por lo que la participación directa de una cinasa de tirosina en la fosforilación del receptor



no puede descartarse del todo [Pizardi et al., 1999].

Nuestros experimentos en los que se estudió el acoplamiento funcional *in vitro* entre los receptores B2 y las proteínas G, por la capacidad de estos para estimular la unión, dependiente de la presencia del agonista, de GTP $\gamma$ S radiactivo a membranas conteniendo a los receptores recombinantes, demostraron que el acoplamiento con la proteína G se mantuvo en membranas de células pretratadas con bradicinina que habían sido preincubadas con genisteína, estos datos ubican al efecto de la genisteína en el punto de acoplamiento entre el receptor y la proteína G y sugieren la existencia de un mecanismo que previene el desacoplamiento entre estas entidades, mismo que ocurre normalmente cuando los receptores son estimulados con la bradicinina.

Por otro lado, se sabe que la actividad catalítica de las cinasas de tirosina esta fuertemente controlada por eventos de fosforilación y desfosforilación de las cinasas mismas. En este contexto, la acción de fosfatasas puede resultar crucial en la actividad de las cinasas. Se conoce que la fosfatasa de tirosina citosólica SHP2 regula la actividad de la cinasa Src [Jackson, 1996]. En experimentos recientes encontramos que al pretratar a las células con oxido de fenil arsina (PAO), un inhibidor de fosfatasas de tirosina, se obtiene un efecto similar al de la genisteína sobre la movilización de calcio inducida por la bradicinina. No se encontraron diferencias significativas al comparar efectos de ambos inhibidores. Toda esta información se reúne en un modelo, en el que sugerimos que una cinasa con especificidad por residuos de tirosina, posiblemente de la familia de Src, al ser inhibida "libera" la actividad de una cinasa de serina/treonina del tipo de la PKC $\delta$  resulta en un aumento en la fosforilación de los sustratos correspondientes, en este caso el receptor para bradicinina del tipo B2, todo este mecanismo, provoca una reducción de la desensibilización del receptor (Figura 9).

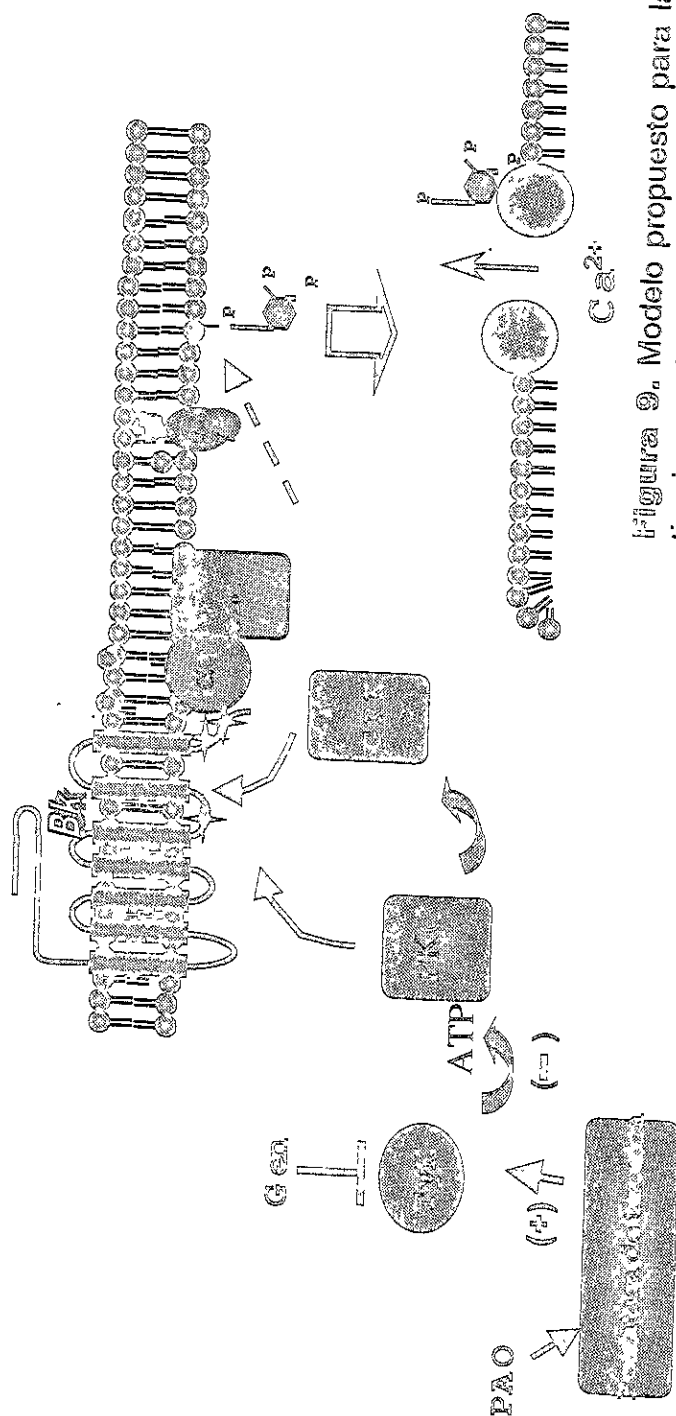


Figura 9. Modelo propuesto para la acción de las cinasas de tirosina en la regulación del receptor B2 para bradicinina. La ocupación del receptor por la bradicinina provoca cambios conformacionales en el receptor desencadenándose la transducción de señales. En condiciones normales, cinasas con especificidad por residuos de serina/treonina (PKC) son reguladas negativamente por una cinasa de tirosina (TyK). Al inhibir las cinasas de tirosina con genisteína, un inhibidor de cinasas de tirosina, se activa la PKC y fosforila al receptor para bradicinina; esta fosforilación posiblemente ocurre en sitios nuevos y depende de la presencia de la bradicinina. La fosforilación del receptor favorece el acoplamiento con la proteína G e impide que el receptor se desensibilice. Alternativamente, la PKC activada puede actuar sobre una GRK y esta fosforilar al receptor para bradicinina. Por otro lado, si se impide la activación de la TyK al inhibir a fosfatasa de tirosina, la PKC puede fosforilar al receptor para bradicinina.

## XVIII. CONCLUSIONES:

Los resultados de esta tesis demuestran que el receptor B2 para bradicinina, expresado por infección con baculovirus recombinantes en células sf21, mantiene las características farmacológicas y de activación de señales intracelulares correspondientes a las de los receptores expresados en los fibroblastos de origen humano, de donde este receptor fue clonado. Estos datos apoyan la utilización de este modelo como herramienta experimental para determinar, en condiciones favorables, la acción de diversos agentes farmacológicos como moduladores de las acciones celulares de estos receptores. Demostramos que los receptores B2 mantienen una alta afinidad de unión por la bradicinina, se localizan adecuadamente en la membrana plasmática, activan la vía de recambio de fosfoinosítidos calcio, a través de su acoplamiento con una proteína endógena (probablemente perteneciente a la familia de  $G_{q/11}$ ) y se desensibilizan por efecto del ligando. Interesantemente, en el mecanismo de desensibilización del receptor participa una cinasa de tirosina, cuya inhibición provocó un incremento en la actividad de los receptores y promovió un aumento en la fosforilación en serina y treonina de los receptores, lo que coincidió con la persistencia de acoplamiento con las proteínas G endógenas, aún en membranas de células pretratadas con bradicinina, lo que indicaría un efecto indirecto de la cinasa de tirosina, sensible a genisteína, sobre la actividad de los receptores B2.

## XIX. REFERENCIAS:

- Abd Alla S, Jarnagin K, Muller-Esterl W, Quittner U. 1996. The N-terminal amino group of [Tyr8]bradykinin is bound adjacent to analogous amino acids of the human and rat B2 receptor. *J Biol Chem* 271(44):27382-7.
- Albers *et al*, 1994. *Molecular Biology of the cell*, 3a ed; Garland New York, cap 15.
- Aiblas J, van Etten I, Moolenaar WH. 1996. Truncated, desensitization-defective neurokinin receptors mediate sustained MAP kinase activation, cell growth and transformation by a Ras-independent mechanism. *EMBO J* 15(13):3351-60.
- Alonso G, Koegl M, Mazurenko N, Courtneidge SA. 1995. Sequence requirements for binding of Src family tyrosine kinases to activated growth factor receptors. *J Biol Chem* 270(17): 9340-8.
- Alla SA, Buschko J, Quittner U, Maidhof A, Haasemann M, Breipohl G, Knoile J, Muller-Esterl W. 1993. Structural features of the human bradykinin B2 receptor probed by agonists, antagonists, and anti-idiotypic antibodies. *J Biol Chem* 268(23):17277-85.
- Baldwin JM. 1994. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6(2):180-90.
- Baldwin JM. 1993. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* (4):1693-703
- Barnes PJ. 1992. Bradykinin and asthma. *Thorax* 47(11):979-83.
- Bar-Sagi D, Rotin D, Batzer A, Mandiyan V, Schlessinger J. 1993. SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* 74(1):83-91.
- Berridge M, Lipp P, Bootman M. 1999. Calcium signalling. *Curr Biol* 9(5):R157-9.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993 361(6410):315-25.
- Beukers MW, Klaassen CH, De Grip WJ, Verzijl D, Timmerman H, Leurs R. 1997. Heterologous expression of rat epitope-tagged histamine H2 receptors in insect Sf9 cells. *Br J Pharmacol* 22(5):867-74.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Wornly K. 1992. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44(1):1-80 .
- Birnbaumer L y Birnbaumer M. 1995. Signal transduction by G protein: 1994 edition. *J Rec Signal Transduct Res* 15:213-252
- Birnbaumer L. 1992. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 71(7):1069-72 .
- Blaukat A, Herzer K, Schroeder C, Bachmann M, Nash N, Muller-Esterl W. 1999. Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry* 38(4):1300-9.
- Blaukat A, Alla SA, Lohse MJ, Muller-Esterl W. 1996. Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J Biol Chem* 271(50):32366-74.
- Biuml K, Mutschler E, Wess J. 1994. Insertion mutagenesis as a tool to predict the secondary structure of a muscarinic receptor domain determining specificity of G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17):7980-4
- Bockaert J, Pin JP. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18(7):1723-9.
- Boone C, Davis NG, Sprague GF Jr. 1993 Mutations that alter the third cytoplasmic loop of the  $\alpha$ -factor receptor lead to a constitutive and hypersensitive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):9921-5.
- Bork P, Margolis B. 1995. A phosphotyrosine interaction domain. *Cell* 80(5):693-4.
- Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, Strader CD, Hess JF. 1995. Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* 270(23):13706-10.
- Bourne HR. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):134-42.
- Bunemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM. 1999. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 61:169-92.
- Bunemann M, Brandts B, Pott L. 1996. Downregulation of muscarinic M2 receptors linked to K<sup>+</sup> current in cultured guinea-pig atrial myocytes. *J Physiol (Lond)* 494 ( Pt 2):351-62.

- Burch RM. 1990. G protein regulation of phospholipase A2: partial reconstitution of the system in cells. *Adv Exp Med Biol* 279:185-95.
- Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P. 1992. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* 360(6405):684-6.
- Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, Cantley LC. 1993. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem* 268(13):9478-83.
- Carty DJ, Padrell E, Codina J, Birnbaumer L, Hildebrandt JD, Iyengar R. 1990. Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three Gi proteins. *J Biol Chem* 265(11):6268-73.
- Chen CC, Chang J, Chen WC. 1995. Role of protein kinase C subtypes alpha and delta in the regulation of bradykinin-stimulated phosphoinositide breakdown in astrocytes. *Mol Pharmacol* 48(1):39-47.
- Chen Y, Grail D, Salcini AE, Pellicci PG, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. 1996. Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J* 15(5):1037-44.
- Chen J, DeVivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, Stoffel RH, et al. 1995. A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science* 268(5214):1166-9.
- Chen X, Earley K, Luo W, Lin SH, Schilling WP. 1996. Functional expression of a human thrombin receptor in Sf9 insect cells: evidence for an active tethered ligand. *Biochem J* 314 ( Pt 2):603-11.
- Chuang TT, Iacovelli L, Salfese M, De Biasi A. 1996. G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci* (11):416-21.
- Clapham DE, Neer EJ. 1997. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37 167-203.
- Clapham DE. 1995. Calcium signaling. *Cell* 80(2):259-68.
- Clapham DE, Neer EJ. 1993. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365(6445):403-6.
- Cleghorn V and Morrison D. 1994. Raf-1 interacts with Fyn and Src in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, Issue 26, 17749-17755.
- Clerk A, Gillespie-Brown J, Fuller SJ, Sugden PH. 1996. Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, protein kinase C translocation, and mitogen-activated protein kinase activity by bradykinin in rat ventricular myocytes: dissociation from the hypertrophic response. *Biochem J* 317 ( Pt 1):109-18.
- Cohen GB, Ren R, Baltimore D. 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80(2):237-48.
- Coutant KD, Corvaja N, Ryder NS. 1995. Bradykinin induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor-receptor and focal adhesion proteins in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 210(3):774-80.
- Cramer H, Muller-Esterl W, Schroeder C. 1998. Subtype-specific endothelin-A and endothelin-B receptor desensitization correlates with differential receptor phosphorylation. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S203-6.
- Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. 1994. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369(6479):418-20.
- Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1998. Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273(2):685-8.
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390(6655):88-91.
- Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD, Lefkowitz RJ. 1997. Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6):2180-5.
- Dalemar LR, Ivy Jong YJ, Wilhelm B, Baenziger NL. 1996. Protein kinases A and C rapidly modulate expression of human lung fibroblast B2 bradykinin receptor affinity forms. *Eur J Cell Biol* 69(3):236-44.
- Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. 1997. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16(23):7032-44.

- Florin-Christensen J, Florin-Christensen M, Delfino JM, Stegmann T, Rasmussen H. 1992. Metabolic fate of plasma membrane diacylglycerols in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 267(21):14783-9.
- Fredericks ZL, Pritcher JA, Lefkowitz RJ. 1996. Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 271(23):13796-803.
- Freedman NJ, Amen A, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ. 1997. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem* 272(28):17734-43.
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ. 1996. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* 51 319-51; discussion 352-3.
- Gagnon AW, Kalfai L, Benovic JL. 1998. Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273(12):6976-81.
- Garritsen A, Simonds WF. Multiple domains of G protein beta confer subunit specificity in beta gamma interaction. *J Biol Chem* 1994 269(39):24418-23.
- Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E. 1994. PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 19(9):349-53.
- Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. 1996. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383(6599):447-50.
- Gotoh N, Tojo A, Hino M, Yazaki Y, Shibuya M. 1992. A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 186(2):768-74.
- Gout I, Dhand R, Hiles ID, Fry MJ, Panayotou G, Das P, Truong O, Totty NF, Hsuan J, Booker GW, et al. 1993. The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell* 75(1):25-36.
- Gudermann T, Schoneberg T, Schultz G. 1997. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 20:399-427.
- Gudermann T, Kaikbrenner F, Schultz G. 1996. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:429-59.
- Gudermann T, Numburg B, Schultz G. 1995. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med* 73(2):51-63.
- Gurkind J, Silvio. 1998. The Pathways Connecting G Protein-coupled Receptors to the Nucleus through Divergent Mitogen-activated Protein Kinase Cascades. *J Biol Chem* 273:1839-1842.
- Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasinski J, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM, Benovic JL. 1995. Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 270(2):720-31.
- Gurevich VV, Chen CY, Kim CM, Benovic JL. 1994. Visual arrestin binding to rhodopsin. Intramolecular interaction between the basic N terminus and acidic C terminus of arrestin may regulate binding selectivity. *J Biol Chem* 269(12):8721-7.
- Habecker BA, Wang H, Nathanson NM. 1993. Multiple second-messenger pathways mediate agonist regulation of muscarinic receptor mRNA expression. *Biochemistry* 32(19):4986-90.
- Haleem-Smith H, Chang EY, Szallasi Z, Blumberg PM, Rivera J. 1995. Tyrosine phosphorylation of protein kinase C-delta in response to the activation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E modifies its substrate recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20):9112-6.
- Hall JM. 1992. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* 56(2):131-90.
- Hamm HE, Glichnst A. 1996. Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 8(2):189-96.
- Hamm HE, Deretic D, Arendt A, Hargrave PA, Koenig B, Hofmann KP. 1988. Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science* 241(4867):832-5.
- Haslam RJ, Koide HB, Hemmings BA. 1993. Pleckstrin domain homology. *Nature* 363(6427):309-10.

- Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 4(11):2881-9. Published erratum appears in *FASEB J* 1990 4(12):3049.
- Hedin KE, Duerson K, Clapham DE. 1993. Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signal* 5(5) 505-18.
- Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. 1997. Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol* 11(9):1266-77.
- Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141(1):85-99.
- Herrlich A, Daub H, Knebel A, Herrlich P, Ullrich A, Schultz G, Gudermann T. 1998. Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15):8985-90.
- Herzig MC, Leeb-Lundberg LM. 1995. The agonist binding site on the bovine bradykinin B2 receptor is adjacent to a sulfhydryl and is differentiated from the antagonist binding site by chemical cross-linking. *J Biol Chem* 270(35) 20591-8.
- Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW. 1992. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184(1):260-8.
- Homma Y, Emori Y. 1995. A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J* 4(2):286-91.
- Horie K, Itoh H, Tsujimoto G. 1995. Hamster alpha 1B-adrenergic receptor directly activates Gs in the transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 48(3):392-400.
- Hoth M, Penner R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355(6358):353-6.
- Hoth M, Penner R. 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol (Lond)* 465:359-86.
- Hubbard SR. 1999. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol* 71(3-4):343-58.
- Hu Y, Rajan L, Schilling WP. 1994. Ca<sup>2+</sup> signaling in Sf9 insect cells and the functional expression of a rat brain M5 muscarinic receptor. *Am J Physiol* 266(6 Pt 1):C1736-43.
- Hug H, Sarre TF. 1993. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 291 ( Pt 2):329-43.
- Hyvonen M, Saraste M. 1997. Structure of the PH domain and Btk motif from Bruzon's tyrosine kinase: molecular explanations for X-linked agammaglobulinemia. *EMBO J* 16(12):3396-404.
- Iismaa TP, Biden TJ, Shine J, eds. 1995. G protein-coupled receptor. New York: Springer. 180 pp.
- Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992. Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* 359(6391):147-50.
- Ishii K, Chen J, Ishii M, Koch WJ, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, Coughlin SR. 1994. Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 269(2):1125-30.
- Ishizaka N, Alexander RW, Laursen JB, Kai H, Fukui T, Oppermann M, Lefkowitz RJ, Lyons PR, Griendling KK. 1997. G protein-coupled receptor kinase 5 in cultured vascular smooth muscle cells and rat aorta. Regulation by angiotensin II and hypertension. *J Biol Chem* 272(51):32482-8.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM, Yuan Y, Salem HH, Cooray P. 1996. Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets. *Thromb Haemost* 76(5):640-50.
- Javitch JA, Fu D, Liapakis G, Chen J. 1997. Constitutive activation of the beta2 adrenergic receptor alters the orientation of its sixth membrane-spanning segment. *J Biol Chem* 272(30):18546-9.
- Ji TH, Grossmann M, Ji L. 1998. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273(28):17299-302.
- Jong YJ, Dalemar LR, Wilhelm B, Baenziger NL. 1993. Human bradykinin B2 receptors isolated by receptor-specific monoclonal antibodies are tyrosine phosphorylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23):10994-8.
- Kallal L, Gagnon AW, Penn RB, Benovic JL. 1998. Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273(1):322-8.

- Kammerer S, Braun A, Arnold N, Roscher AA. 1995. The human bradykinin B2 receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 211(1):226-33.
- Kashishian A, Kaziauskas A, Cooper JA. 1992. Phosphorylation sites in the PDGF receptor with different specificities for binding GAP and PI3 kinase in vivo. *EMBO J* 11(4):1373-82. Published erratum appears in *EMBO J* 1992 11(10):3809
- Kavanaugh WM, Turck CW, Williams LT. 1995. PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science* 268(5214):1177-9.
- Kazuko Haga, Kimihiko Kameyama, Tatsuya Haga, Ushio Kikkawa, Kazumasa Shiozaki, and Haruaki Uchiyama. 1996. Phosphorylation of Human m1 Muscarinic Acetylcholine Receptors by G Protein-coupled Receptor Kinase 2 and Protein Kinase C. *J Biol Chem* 271: 2776-2782.
- Kehlenbach RH, Matthey J, Huttner WB. 1995. XL alpha 5 is a new type of G protein. *Nature* 1994 372(6508):804-9
- Kamps, MP. 1991. Determination of phosphoaminoacid composition by acid hydrolysis of protein blotted to immobilon. In Sefton BM y Hunter T (editores). 1998. *Protein Phosphorylation (selected Methods in enzymology)*. Academic Press, San Diego CA. pag 193-199.
- Kim D, Lewis DL, Graziadei L, Neer EJ, Bar-Sagi D, Clapham DE. 1989. G-protein beta gamma-subunits activate the cardiac muscarinic K<sup>+</sup>-channel via phospholipase A2. *Nature* 337(6207):557-60.
- Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992. Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol Chem* 267(3):1430-3.
- Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ. 1994. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26):12706-10.
- Koshiba S, Kigawa T, Kim JH, Shirouzu M, Bowtell D, Yokoyama S. 1997. The solution structure of the pleckstrin homology domain of mouse Son-of-sevenless 1 (mSos1). *J Mol Biol* 269(4):579-91.
- Kosugi S, Mori T. 1994. The third extracellular loop of the thyrotropin receptor is partially involved in signal transduction. *FEBS Lett* 349(1):89-92.
- Kosugi S, Okajima F, Ban T, Hidaka A, Shenker A, Kohn LD. 1993. Substitutions of different regions of the third cytoplasmic loop of the thyrotropin (TSH) receptor have selective effects on constitutive, TSH-, and TSH receptor autoantibody-stimulated phosphoinositide and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signal generation. *Mol Endocrinol* 7(8):1009-20.
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. 1997. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 272(1):5-8.
- Krupnick JG, Gurevich VV, Schepers T, Hamm HE, Benovic JL. 1994. Arrestin-rhodopsin interaction. Multi-site binding delineated by peptide inhibition. *J Biol Chem* 269(5):3226-32.
- Kuang Y, Wu Y, Jiang H, Wu D. Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors. *J Biol Chem* 1996 271(8):3975-8.
- Kunepui P, Gurevich VV, Benovic JL. 1994. Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J Biol Chem* 269(14):10209-12.
- Langhans-Rajasekaran SA, Wan Y, Huang XY. 1995. Activation of Tsk and Btk tyrosine kinases by G protein beta gamma subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19):8601-5.
- Lee SB, Rhee SG. 1995. Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr Opin Cell Biol* 7(2):183-9.
- Lee CW, Lee KH, Lee SB, Park D, Rhee SG. 1994. Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. *J Biol Chem* 269(41):25335-8.
- Leeb T, Mathis SA, Leeb-Lundberg LM. 1997. The sixth transmembrane domains of the human B1 and B2 bradykinin receptors are structurally compatible and involved in discriminating between subtype-selective agonists. *J Biol Chem* 272(1):311-7.
- Leeb-Lundberg LM, Song XH, Mathis SA. 1994. Focal adhesion-associated proteins p125FAK and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 269(39):24328-34.



- Leeb-Lundberg LM, Song XH. 1993. Identification of p125, a component of a group of 120-kDa proteins that are phosphorylated on tyrosine residues in response to bradykinin and bombesin stimulation, in anti-ras-GTPase-activating protein immunoprecipitates of Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 268(11):8151-7.
- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K, Daaka Y. 1998. Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol*;42:416-20.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. 1996. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85(5):621-4.
- Lemmon MA, Ferguson KM, O'Brien R, Sigler PB, Schlessinger J. 1995. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23):10472-6.
- Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376(6543):737-45.
- Liao JK, Homcy CJ. 1993. The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. *J Clin Invest* 92(5):2168-72.
- Liebmann C, Mammery K, Graness A. 1994. Bradykinin inhibits adenylate cyclase activity in guinea pig ileum membranes via a separate high-affinity bradykinin B2 receptor. *Eur J Pharmacol* 288(1):35-43.
- Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. 1997. Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin. *J Biol Chem* 272(49):31051-7.
- Linder ME, Ewald DA, Miller RJ, Gillman AG. 1990. Purification and characterization of G<sub>o</sub> alpha and three types of G<sub>i</sub> alpha after expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265(14):8243-51.
- Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA. 1995. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270(21):12563-8.
- Liu WS, Heckman CA. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 10(8):529-42.
- Liu X, Brodeur SR, Gish G, Songyang Z, Cantley LC, Laudano AP, Pawson T. 1993. Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene* 8(5):1119-26.
- Lohse MJ. 1993. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179(2):171-88.
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* 267(12):8558-64.
- Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 265(6):3202-11.
- Loisel TP, Ansanay H, St-Onge S, Gay B, Boulanger P, Strosberg AD, Marullo S, Bouvier M. 1997. Recovery of homogeneous and functional beta 2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles. *Nat Biotechnol* 15(12):1300-4.
- Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Weizker R. 1997. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275(5298):394-7.
- Lorte M, Regoli D, Rhaleb NE, Plante GE. 1992. The role of B1- and B2-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am J Physiol* 262(1 Pt 2):R72-6.
- Luo H, Lindeman RP, Chase HS Jr. 1992. Participation of protein kinase C in desensitization to bradykinin and to carbachol in MDCK cells. *Am J Physiol* 262(3 Pt 2):F499-506.
- Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ. 1997. Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem* 272(7):4637-44.
- Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, Lefkowitz RJ. 1996. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 271(32):19443-50.
- Macias MJ, Musacchio A, Ponstingl H, Nilges M, Saraste M, Oschkinat H. 1994. Structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin. *Nature* 369(6482):675-7.

- McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Oberholte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K. 1991. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17):7724-8.
- Mahan LC, Burch RM. 1990. Functional expression of B2 bradykinin receptors from Balb/c cell mRNA in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 37(6):785-9.
- Marceau F, Larrivee JF, Saint-Jacques E, Bachvarov DR. 1997. The kinin B1 receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 75(6):725-30.
- Marceau F. 1995. Kinin B1 receptor: a review. *Immunopharmacology* 30:1-26.
- Matsuda M, Mayer BJ, Hanafusa H. 1991. Identification of domains of the v-crk oncogene product sufficient for association with phosphotyrosine-containing proteins. *Mol Cell Biol* 11(3):1607-13.
- Mayer BJ, Ren R, Clark KL, Baltimore D. 1993. A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73(4):629-30.
- Mayer BJ, Jackson PK, Van Ertten RA, Baltimore D. 1992. Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol Cell Biol* 12(2):609-18.
- Mayer BJ, Jackson PK, Baltimore D. 1991. The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(2):627-31.
- Menke JG, Borkowski JA, Bienko KK, MacNeil T, Derick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DW y Hess J. 1994. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269: 21583-21586.
- Milligan G, Parenti M, Magee AI. 1995. The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20(5):181-7.
- Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J. 1996. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol* 16(3):977-89.
- Mohammadi M, Dionne CA, Li W, Li N, Spivak T, Honegger AM, Jaye M, Schlessinger J. 1992. Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature* 358(6388):681-4.
- Montero M, Alvarez J, Garcia-Sancho J. 1999. Agonist-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. *Biochem J* 277 ( Pt 1):73-9.
- Mori S, Ronnstrand L, Yokote K, Engstrom A, Courneridge SA, Claesson-Welsh L, Heldin CH. 1993. Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor, involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J* 12(6):2257-64.
- Morishita R, Nakayama H, Isobe T, Matsuda T, Hashimoto Y, Okano T, Fukada Y, Mizuno K, Ohno S, Kozawa O, et al 1995. Primary structure of a gamma subunit of G protein, gamma 12, and its phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem* 270(49):29469-75.
- Morris AJ, Rudge SA, Mahlum CE, Jenco JM. 1995. Regulation of phosphoinositide-3-kinase by G protein beta gamma subunits in a rat osteosarcoma cell line. *Mol Pharmacol* 48(3):532-9.
- Muller-Esterl W. 1989. Kininogens, kinins and kinships. *Thromb Haemost* 61(1):2-6.
- Munoz CM, Leeb-Lundberg LM. 1992. Receptor-mediated internalization of bradykinin. DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways. *J Biol Chem* 267(1):303-9.
- Musacchio A, Wilmanns M, Saraste M. 1994. Structure and function of the SH3 domain. *Prog Biophys Mol Biol* 61(3) 283-97
- Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Saraste M. 1993. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem Sci* 18(9):343-8.
- Neer EJ. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80(2):249-57.
- New DC, Wong JT. 1998. The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. *Biol Signals Recept* 7(2):98-108 .
- Newton CA. 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*. 9:161-167.

- Ng GY, Trogadis J, Stevens J, Bouvier M, O'Dowd BF, George SR. 1995. Agonist-induced desensitization of dopamine D<sub>1</sub> receptor-stimulated adenylyl cyclase activity is temporally and biochemically separated from D<sub>1</sub> receptor internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22):10157-61.
- Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M, O'Dowd B. 1994. Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D<sub>1</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 267(1):7-19.
- Nishimura K, Frederick J, Kwatra MM. 1998. Human substance P receptor expressed in Sf9 cells couples with multiple endogenous G proteins. *J Recept Signal Transduct Res* 18(1):51-65.
- Nishizuka Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258(5082):607-14.
- Noh DY, Shin SH, Rhee SG. 1995. Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1242(2):99-113.
- Novoyny EA, Bednar DL, Connolly MA, Connor JR, Stormann TM. 1994. Mutation of aspartate residues in the third extracellular loop of the rat B2 bradykinin receptor decreases affinity for bradykinin. *Biochem Biophys Res Commun* 201(2):523-30.
- Numberg B, Gudermann T, Schultz G. 1995. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J Mol Med* 73(3):123-32  
Published erratum appears in *J Mol Med* 1995 Jul;73(7):379
- Offermanns S, Schultz G. 1994. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350(4):329-38.
- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141(1):101-14.
- Ohguro H, Palczewski K, Ericsson LH, Walsh KA, Johnson RS. 1993. Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry* 32(21):5718-24.
- Oliviera L, Paiva ACM, Sander C y Vried G. 1994. A common step for signal transduction in G protein-coupled receptor. *Trends Pharmacol Sci* 15, 170-172.
- Onorato JJ, Gillis ME, Liu Y, Benovic JL, Ruocho AE. 1995. The beta-adrenergic receptor kinase (GRK2) is regulated by phospholipids. *J Biol Chem* 270(36):21346-53.
- Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW, Lefkowitz RJ. 1996. Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem* 271(22):13266-72.
- Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18):8319-23.
- Palmer TM, Gettys TW, Stiles GL. 1995. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J Biol Chem* 270(28):16895-902.
- Pals-Ryjaarsdam R, Hosey MM. 1997. Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 272(22):14152-8
- Parsons JT, Parsons SJ. 1993. Protein-tyrosine kinases, oncogenes, and cancer. *Important Adv Oncol*: 3-17.
- Pawson T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373(6515):573-80.
- Pawson T. 1993. Signal transduction--a conserved pathway from the membrane to the nucleus. *Dev Genet* 14(5):333-8.
- Pei G, Tiberi M, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1994. An approach to the study of G-protein-coupled receptor kinases: an in vitro-purified membrane assay reveals differential receptor specificity and regulation by G beta gamma subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9):3633-6.
- Pesquero JB, Lindsey CJ, Zeh K, Paiva AC, Ganten D, Bader M. 1994. Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J Biol Chem* 269(43):26920-5.
- Peters KG, Mane J, Wilson E, Ives HE, Escobedo J, Del Rosario M, Mirda D, Williams LT. 1992. Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca<sup>2+</sup> flux but not mitogenesis. *Nature* 358(6388):678-81.
- Phillips E, Conder MJ, Bevan S, McIntyre P, Webb M. 1992. Expression of functional bradykinin receptors in *Xenopus*

oocytes *J Neurochem* 58(1):243-9.

Pin JP, y Bockaert J. 1995. Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 5. 342-349.

Pippig S, Andexinger S, Daniel K, Puzicha M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ. 1993. Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 268(5):3201-8

Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67:653-92.

Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ. 1995. The G-protein-coupled receptor phosphatase, a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(18):8343-7.

Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ. 1995. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem* 270(20):11707-10.

Pizarro A, Braukat A, Muller-Esterl W, Alhenc-Gelas F, Rejzerson RM. 1999. Bradykinin-induced internalization of the human B2 receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J Biol Chem* 274(18):12738-4.

Plakidou-Dymock S, Dymock D, Hooley R. 1998. A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol Mar* 12;8(6):315-24.

Polosa R. 1993. Role of the kinin-kallikrein pathway in allergic diseases. *Allergy* 48(4):217-25.

Prado GN, Taylor L, Polgar P. 1997. Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B2 receptor. *J Biol Chem* 272(23):14638-42.

Pronin AN, Gautam N. 1992. Interaction between G-protein beta and gamma subunit types is selective. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13):6220-4.

Proud D, Reynolds CJ, MacGlashan D, Newball HH, Schulman ES y Lichtenstein LM. 1985. Immunoglobulin E-mediated release of kininogenase from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 132: 405-408.

Putney JW Jr, Bird GS. The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev* 1993 14(5):610-31.

Pyne S, Pyne NJ. 1993. Differential effects of B2 receptor antagonists upon bradykinin-stimulated phospholipase C and D in guinea-pig cultured tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 110(1):477-81.

Rao GN, Delafontaine P, Runge MS. 1995 Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270(46):27871-5.

Ray K, Kunsch C, Bonner LM, Robishaw JD. 1995. Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J Biol Chem* 270(37):21765-71.

Rebecchi M. J. and Scarlata S..1998. PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAINS: A Common Fold with Diverse Functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27:503-528.

Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ. 1998. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348(1):1-10.

Regoli D, Calo G, Rizzi A, Bogoni G, Gobeil F, Campobasso C, Mollica G, Beani L. 1996. Bradykinin receptors and receptor ligands (with special emphasis on vascular receptors). *Regul Pept* 65(1):83-9.

Regoli D, Jukic D, Gobeil F, Rhaieb NE. 1993. Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can J Physiol Pharmacol* 71(8):556-67.

Regoli D, Barabe J. 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev Mars* 32(1):1-46.

Ren Q, Kurose H, Lefkowitz RJ y Cotecchia S. 1993. Constitutively active mutants of the alpha 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 268(22):16483-7.

Rhee SG, Choi KD. 1992. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 267(18):12393-6.

Ricupero D, Taylor L, Polgar P. 1993. Interactions of bradykinin, calcium, G-protein and protein kinase in the activation of

phospholipase A2 in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Agents Actions* 40(1-2):110-8.

Roberts RA, Gullick WJ. 1990. Bradykinin receptors undergo ligand-induced desensitization. *Biochemistry* 29(8):1975-9.

Rodell TC. 1996. The kallikrein/kinin system and kinin antagonists in trauma. *Immunopharmacology* 33(1-3):279-83.

Rodriguez-Fernandez JL, Rozengurt E. 1998. Bombesin, vasopressin, lysophosphatidic acid, and sphingosylphosphorylcholine induce focal adhesion kinase activation in intact Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 273(30):19321-8.

Rodriguez-Fernandez JL, Rozengurt E. 1996. Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. Dissociation from tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 271(44):27895-901.

Roscher AA, Manganiello VC, Jelsema CL, Moss J. 1984. Autoregulation of bradykinin receptors and bradykinin-induced prostacyclin formation in human fibroblasts. *J Clin Invest* 74(2):552-8.

Roth A, Krænenkamp HJ, Meyerhof W, Richter D. 1997. Phosphorylation of four amino acid residues in the carboxyl terminus of the rat somatostatin receptor subtype3 is crucial for its desensitization and internalization. *J Biol Chem* 272(38):23769-74.

Runnels LW, Jenco J, Morris A, Scarlata S. 1996. Membrane binding of phospholipases C-beta 1 and C-beta 2 is independent of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the alpha and beta gamma subunits of G proteins. *Biochemistry* 35(51):16824-32.

Sadowski I, Stone JC, Pawson. 1986. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol* (12T):4396-408.

Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. 1993. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 268(7):4625-36.

Satoh M, Miyamoto C, Terashima H, Tachibana Y, Wada K, Watanabe T, Hayes AE, Gentz R, Furuichi Y. 1997. Human endothelin receptors ET(A) and ET(B) expressed in baculovirus-infected insect cells--direct application for signal transduction analysis. *Eur J Biochem* 249(3):803-11.

Schaffhausen B. 1995. SH2 domain structure and function. *B.B.Acta* 1242:61-75.

Sadoshima J, Izumo S. 1996. The heterotrimeric G q protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J* 15(4):775-87.

Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG, Cotecchia S. 1996. Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J* 15(14):3566-78.

Schmidt CJ, Thomas TC, Levine MA, Neer EJ. 1992. Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J Biol Chem* 267(20):13807-10.

Schoikens BA. 1996. Kinins in the cardiovascular system. *Immunopharmacology* 33(1-3):209-16.

Seguin L, Widdowson PS, Giesen-Crouse E. 1992. Existence of three subtypes of bradykinin B2 receptors in guinea pig. *J Neurochem* 59(6):2125-33.

Shaw G. 1996. The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays* 18(1):35-46.

Shenker A. 1995. G protein-coupled receptor structure and function: the impact of disease-causing mutations. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 9(3):427-51.

Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ Jr, Minegishi T, Cutler GB Jr. 1993. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 365(6447):652-4.

Shinomura T, Asaoka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y. 1991. Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12):5149-53.

Schlador ML, Nathanson NM. 1997. Synergistic regulation of m2 muscarinic acetylcholine receptor desensitization and sequestration by G protein-coupled receptor kinase-2 and beta-arrestin-1. *J Biol Chem* 272(30):18882-90.

Simon MI, Strahmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252(5007):802-8.

Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L. 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365(6442):170-5.

- Smith MR, Liu YL, Matthews NT, Rhee SG, Sung WK, Kung HF. 1994. Phospholipase C-gamma 1 can induce DNA synthesis by a mechanism independent of its lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14):6554-8.
- Smrcka AV, Sternweis PC. 1993. Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J Biol Chem* 268(13):9667-74.
- Stadel JM, Strulovici B, Nambi P, Lavin TN, Briggs MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1983. Desensitization of the beta-adrenergic receptor of frog erythrocytes. Recovery and characterization of the down-regulated receptors in sequestered vesicles. *J Biol Chem* 258(5):3032-8.
- Sterne-Marr R, Benovic JL. 1995. Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins. *Vitam Horm* 51:193-234.
- Stoffel RH, Randall RR, Premont RT, Lefkowitz RJ, Inglesse J. 1994. Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J Biol Chem* 269(45):27791-4.
- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. 1994. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63:101-32.
- Superi-Furga G, Courtneidge SA. 1995. Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *Bioessays* 17(4):321-30.
- Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW Jr. 1989. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 264(21):12266-71.
- Taylor WC y Broad ML. 1998. Pharmacological analysis of intracellular: problems and pitfalls. *Trends Pharmacology Science* 19:370-375.
- Timm D, Salim K, Gout I, Guruprasad L, Waterfield M, Blundell T. 1994. Crystal structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. *Nat Struct Biol* 1(11):782-8.
- Tippmer S, Bossenmaier B, Haring H. 1996. Bradykinin induces tyrosine phosphorylation in human foreskin fibroblasts and 293 cells transfected with rat B2 kinin receptor. *Eur J Biochem* 236(3):953-9
- Thomas SM, Brugge JS. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*;13:513-609.
- Touhara K, Inglesse J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ. 1994. Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 269(14):10217-20.
- Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Honma T, Lameh J, Sadee W. 1998. Internalization and down-regulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Role of third intracellular m2 loop and G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 273(9):5323-30.
- Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Kurose H, Nagao T. 1994. Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. *J Biol Chem* 269(51):32522-7.
- Tsukada S, Simon MI, Witte ON, Katz A. 1994. Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23):11256-60
- Ullrich A, Schlessinger J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2):203-12.
- Urrutia R, Henley JR, Cook T, McNiven MA. 1997. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2):377-84.
- van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* (6):698-714.
- van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 1995. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376(6543):781-4
- Valiquette M, Parent S, Loisei TP, Bouvier M. 1995. Mutation of tyrosine-141 inhibits insulin-promoted tyrosine phosphorylation and increased responsiveness of the human beta 2-adrenergic receptor. *EMBO J* 14(22):5542-9.
- Vaughan M. 1998. G protein-coupled receptors minireview series. *J Biol Chem* 273(28):17297.
- Vazquez-Prado J, Medina LC, Garcia-Sainz JA. 1997. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of

- alpha1b-adrenoreceptors in Rat-fibroblasts. *J Biol Chem* 272(43):27330-7.
- Vernier P, Cardinaud B, Valdenaire O, Philippe H, Vincent JD. 1995. An evolutionary view of drug-receptor interaction: the biogenic amine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* (11):375-81.
- Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL. 1996. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274(5295):2086-9.
- de Weerd WF, Leeb-Lundberg LM. 1997. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galpha12 in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272(28):17858-66.
- Weiss A, Schliessinger J. 1998. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 94(3):277-80.
- Wess J. 1997. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* 11(5):346-54.
- Wess J, ed. 1995. *Molecular mechanisms of muscarinic acetylcholine receptor function*. New York: Springer 272 pp.
- Wolsing DH, Rosenbaum JS. 1991. Bradykinin-stimulated inositol phosphate production in NG108-15 cells is mediated by a small population of binding sites which rapidly desensitize. *J Pharmacol Exp Ther* 257(2):621-33.
- Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. 1995. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 47(2):322-9.
- Yagisawa H, Hirata M, Kanematsu T, Watanabe Y, Ozaki S, Sakuma K, Tanaka H, Yabuta N, Kamata H, Hirata H, et al. 1994. Expression and characterization of an inositol 1,4,5-trisphosphate binding domain of phosphatidylinositol-specific phospholipase C-delta 1. *J Biol Chem* 269(31):20179-88.
- Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fulle HJ. 1995. Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(2):602-6.
- Yang CM, Hsia HC, Chou SP, Ong R, Hsieh JT, Luo SF. 1994. Bradykinin-stimulated phosphoinositide metabolism in cultured canine tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 111(1):21-8.
- Yao L, Kawakami Y, Kawakami T. 1994. The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* Sep 13;91(19):9175-9.
- Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, et al. 1986. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323(6085):226-32.
- Zeisei SH. 1993. Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J* 7(6):551-7.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG, Ferguson SS. 1997. A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem* 272(43):27005-14.
- Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Menard L, Caron MG. 1996. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271(31):18302-5.
- Zhang J, Zhang J, Benovic L, Sugai M, Wetzker R, Gout I, Rittenhouse SE. 1995. Sequestration of a G-protein beta gamma subunit or ADP-ribosylation of Rho can inhibit thrombin-induced activation of platelet phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem* 270(12):6589-94.
- Zheng C, Xing Z, Bian ZC, Guo C, Akbay A, Warner L, Guan JL. 1998. Differential regulation of Pyk2 and focal adhesion kinase (FAK). The C-terminal domain of FAK confers response to cell adhesion. *J Biol Chem* 273(4):2384-9.
- Zhou MM, Ravichandran KS, Ciejnizak EF, Petros AM, Meadows RP, Sattler M, Harlan JE, Wade WS, Burakoff SJ, Fesik SW. 1995. Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* 378(6557):584-92.
- Zhu X, Birnbaumer L. 1995. G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs- and Gi-coupled receptors: Lack of receptor selectivity for Galpha(16) and evidence for a synergic interaction between Gbeta gamma and the alpha subunit of a receptor activated G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7):2827-31.