

00591

1



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

REGULACION DE LA RESPUESTA  
ALFA 1b- ADRENERGICA

T E S I S

Que para optar por el Grado de  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS  
Presenta la Q.F.B.

PATRICIA CASAS GONZALEZ



281165

México, D. F.

2000

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.


---

**"REGULACIÓN DE LA RESPUESTA  
 $\alpha_{1b}$ -ADRENÉRGICA"**

**Q.F.B. Patricia Casas González**

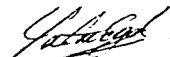
Esta tesis se realizó en el departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz. Este proyecto fue apoyado por la DGAPA (IN 200596 e IN 205199) y el CONACyT (27569N).

**ASESOR DEL PROYECTO:**



Dr. J. Adolfo García Sáinz

**SUSTENTANTE:**



Q.F.B. Patricia Casas González

**MIEMBROS DEL JURADO:**

Presidente:	Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou
Primer vocal:	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Segundo vocal:	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Tercer vocal:	Dr. Jorge Vázquez Ramos
Secretario:	Dr. José Pedraza Chaverri
Primer suplente:	Dr. Fernando López Casillas
Segundo suplente:	Dr. Ignacio Camacho Arroyo

*A mis padres,*

*Cuyas vidas han sido una motivación  
para seguir adelante.*

*A mis hermanos,*

*quienes siempre me han brindado su  
apoyo y cariño.*

*A Said, Paulina, Lalito, Dany y Kimena,*

*con profundo cariño.*

## AGRADECIMIENTOS

*Deseo expresar mi gratitud al Dr. Adolfo García Sáinz, por la dirección de esta tesis, por su apoyo y por sus enseñanzas durante mi formación académica.*

*A la Dra. Rosario Muñoz Clares y al Dr. Rolando Hernández Muñoz, por sus sugerencias y enseñanzas durante mis estudios de posgrado.*

*A los miembros del jurado, por su contribución en la revisión crítica del presente trabajo.*

*A la DGAPA, por haberme otorgado las becas para la realización de mis estudios de posgrado.*

*A mis compañeros de laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos y por su continua ayuda en el trabajo diario.*

*A Lety García, por su incansable apoyo secretarial.*

*A Rocío Alcántara y a Maura Cárdenas, por su valiosísima ayuda para hacer realidad este proyecto y sobre todo por su amistad incondicional.*

*A José Vázquez y a Guadalupe Reyes, por su gran amistad y por todos los momentos compartidos.*

*A Criselda Mendoza y a Tere Lara, por su invaluable amistad, mil gracias.*

*A Alfredo Zaldivar, por su amistad y ayuda brindadas durante tantos años.*

## ÍNDICE

ABSTRACT .....	1
RESUMEN .....	2
INTRODUCCIÓN .....	4
Receptores acoplados a proteínas G .....	6
Proteínas G .....	7
Mecanismos de regulación .....	12
Desensibilización .....	13
Fosforilación .....	16
Desensibilización heteróloga .....	17
Desensibilización homóloga .....	19
La familia de las GRKs .....	21
Las arrestinas .....	24
Internalización de los GPCRs .....	28
Las $\beta$ -arrestinas y las GRKs .....	
en la internalización de los GPCRs .....	30
Internalización y desensibilización .....	33
Internalización y resensibilización .....	35
Receptores adrenérgicos .....	37
El receptor $\alpha_{1B}$ -adrenérgico .....	39
Sistema de fosfoinosítidos-calcio .....	39
Regulación del receptor $\alpha_{1B}$ -adrenérgico .....	40
El ácido lisofosfatídico .....	42
Acciones biológicas del LPA .....	44
Receptores para ácido lisofosfatídico .....	45
Vías de señalización del LPA .....	47
La fosfatidilinositol 3-cinasa .....	48
PI3K clase I .....	50
Inhibidores de la PI3K .....	52
JUSTIFICACIÓN .....	54
OBJETIVOS .....	55
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	57
RESULTADOS .....	61
DISCUSIÓN .....	65
PERSPECTIVAS .....	73
REFERENCIAS .....	81



## ABSTRACT

---

Cells display processes of adaptation in response to a stimulus. Desensitization is a general mechanism of this adaptation. This process is mediated, at least in part, by receptor phosphorylation. Previous studies have shown that transmodulation between receptors linked to different signaling pathways may represent an important mechanism of receptor responsiveness regulation. In order to study the regulation of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic responsiveness, the present work was designed to investigate the effect of lysophosphatidic acid (LPA) on  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor ( $\alpha_{1B}$ -AR) phosphorylation and function. LPA is an important constituent of serum and activates several signaling pathways through multiple types of G-proteins involving the participation of distinct protein kinases. In this study, we demonstrated that LPA induces a rapid and sustained phosphorylation of the  $\alpha_{1B}$ -ARs, transfected into rat-1 fibroblasts. LPA stimulated  $\alpha_{1B}$ -AR phosphorylation in a dose-dependent fashion. The effect of LPA was blocked by pretreatment of the cells with pertussis toxin. The  $\alpha_{1B}$ -AR phosphorylation induced by LPA was significantly blocked by inhibitors of protein kinase C (staurosporine, bisindolylmaleimide 1, and Ro-318220) and phosphoinositide 3-kinase (wortmannin and LY 294002); but it was not inhibited by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. The effect of LPA on  $\alpha_{1B}$ -AR phosphorylation was related to its functional desensitization. The ability of norepinephrine to increase cytosol calcium concentration was markedly decreased in cells previously challenged with LPA. Norepinephrine-induced [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding was markedly decreased in membrane preparations from cells pretreated with LPA. This effect of LPA was blocked by pretreatment with wortmannin or staurosporine.

Our data indicate that activation of LPA receptors induces  $\alpha_{1B}$ -AR phosphorylation and receptor-G protein uncoupling. These effects are mediated through pertussis toxin-sensitive G proteins, phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C.

---

---

## RESUMEN

---

---

Las células tienen la capacidad de dar una respuesta coordinada a uno o varios estímulos, manteniendo una relación adecuada con el medio que las rodea. Con la finalidad de lograr este equilibrio, regulando finamente funciones esenciales que les permitan sobrevivir, las células han desarrollado procesos de adaptación como respuesta a estímulos tal como lo ejemplifica el fenómeno de desensibilización. Este proceso se encuentra regulado, al menos en parte, por eventos de fosforilación y desfosforilación de los receptores encargados de mediar los efectos de los estímulos que la célula recibe. En estudios previos se ha demostrado que la activación de un determinado tipo de receptor puede regular la actividad de más de un efector, lo cual le permite regular múltiples vías de transducción, e incluso regular la actividad de otros receptores. Actualmente se sabe que la modulación de la actividad entre distintos tipos de receptores asociados o no a una misma vía de transducción, puede representar un importante mecanismo para la regulación de la respuesta ejercida por un receptor. Al respecto, este trabajo se diseñó para investigar la participación del ácido lisofosfatídico (LPA) en la regulación de la respuesta  $\alpha_{1B}$ -adrenérgica. El LPA es un fosfolípido mediador de diversas respuestas celulares, que puede activar múltiples vías de señalización a través de diferentes proteínas G, involucrando la participación de distintas proteínas cinasas. En este trabajo se demuestra que la activación de los receptores para LPA induce de manera rápida y sostenida la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, transfectado en fibroblastos rat-1. Este efecto sobre el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico es dependiente de la concentración de LPA y puede bloquearse al preincubar las células con toxina *pertussis*, lo que nos indica la participación de una proteína G del tipo Gi. Por otra parte, la fosforilación del receptor adrenérgico estimulada por LPA se bloquea por efecto de inhibidores para la proteína cinasa C (PKC), como son estaurosporina, bisindolilmaleimida y Ro 318220; de igual forma

---

sucede con los inhibidores para la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), wortmanina y LY 294002, y no así con genisteína, un inhibidor de proteínas cinasas de residuos de tirosinas.

El efecto del LPA sobre la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico está asociado con la desensibilización funcional del receptor, debido a que el LPA bloquea la capacidad de la norepinefrina para movilizar calcio intracelular. Además, el LPA altera el acoplamiento entre el receptor adrenérgico y su proteína G, impidiendo con ello la unión de GTP $\gamma$ S estimulada por norepinefrina. Este efecto del LPA sobre la funcionalidad del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico se revierte al preincubar a las células con los inhibidores de cinasas, estaurosporina y wortmanina y también por efecto de la preincubación con toxina *pertussis*.

Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que la activación de los receptores para LPA regula la funcionalidad de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos mediante procesos de fosforilación y desensibilización, involucrando proteínas G $_i$  y proteínas cinasas PKC y PI3K.

---

La investigación en el área de los mecanismos celulares de la transducción de señales constituye actualmente uno de los campos más excitantes del estudio biológico. Desde hace tiempo se sabe que numerosas señales intracelulares son transmitidas a través de la membrana celular, por interacciones específicas proteína-proteína. Además de su papel estructural como barreras selectivamente permeables, las membranas biológicas albergan numerosos componentes funcionales, los cuales han sido una fuente de estudio de gran interés durante muchos años. De la enorme multitud de proteínas embebidas en las membranas biológicas, un gran número de ellas son receptores. Estos receptores transmembranales permiten a las señales extracelulares (ya sean hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento o factores antiproliferativos) transmitir su información al interior de las células, donde se puede generar una respuesta apropiada mediante la extensa red de proteínas que transducen la señal. Dichas proteínas tienen la característica de compartir un limitado repertorio de pequeños dominios modulares, que son protagonistas clave en la regulación de las vías de transducción de señales.

---

Estos sistemas de transducción de señales generalmente están formados por tres componentes: un **receptor transmembranal**, un **elemento transductor** y un **efector bloquímico**, que genera segundos mensajeros intracelulares. Estos últimos tienen como blancos de acción proteínas citoplásmicas denominadas cinasas y fosfatasa que al ser activadas pueden fosforilar y desfosforilar (respectivamente) a sus sustratos, generando así la activación o la inhibición de alguna función celular, lo que entonces dará lugar a un efecto fisiológico final, como puede ser contracción, vasodilatación, captación de olores, expresión de genes, secreción, proliferación, diferenciación o muerte celular, entre otros.

Una célula tiene la capacidad de responder a una gran cantidad de estímulos externos gracias a la diversidad de receptores que presenta. De éstos se pueden mencionar tres tipos: aquellos receptores que presentan actividad catalítica, particularmente de cinasa de residuos de tirosina; aquellos que se asocian a una función efectora tipo canal, y los receptores que se acoplan a proteínas G, los cuales describiré detalladamente por ser los actores principales de este trabajo.

---

---

## RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son proteínas integrales de la membrana que están involucradas en la transmisión de las señales del ambiente extracelular al citoplasma. La familia de los receptores acoplados a proteínas G actualmente comprende a más de 1000 miembros; todos ellos exhiben un motivo estructural común consistente de siete regiones que atraviesan la membrana (Dohliman *et al.*, 1987) [Fig. 1]. Una diversa gama de estímulos externos, incluyendo neurotransmisores, hormonas, fosfolípidos, fotones, olores, ciertos sabores y factores de crecimiento, pueden activar a miembros específicos de esta familia de receptores y promover la interacción entre el receptor y la proteína G del lado intracelular de la membrana. Este tipo de receptores realizan una función fundamental en la regulación de una amplia variedad de eventos biológicos, entre los que podemos mencionar fototransducción, captación de olores, de sabores, función cardiovascular, neurotransmisión y respuesta hormonal.

Los receptores de siete dominios transmembranales pueden acoplarse con más de una proteína G, pudiendo generar con ello una transducción de señales multifuncional [Fig. 2]. Muchos de estos receptores comparten vías de señalización que son activadas con diferentes grados de eficiencia por una hormona particular. La señal intracelular

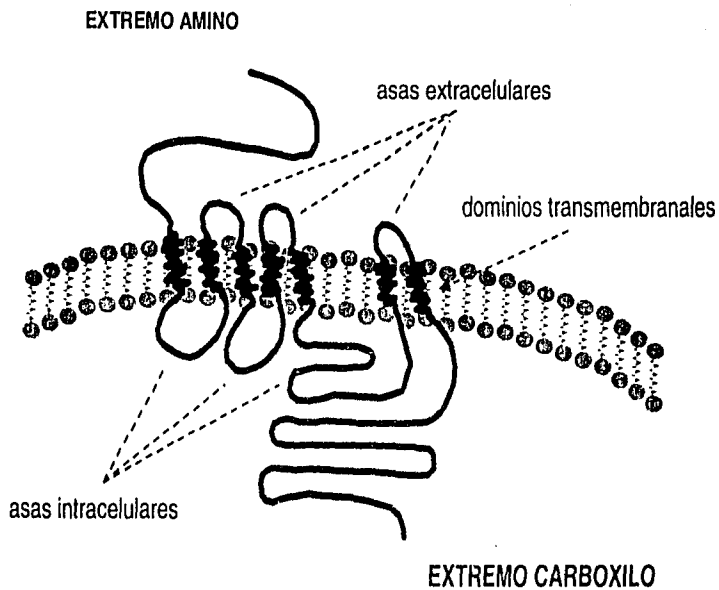


Fig. 1. Modelo estructural de los receptores acoplados a proteínas G

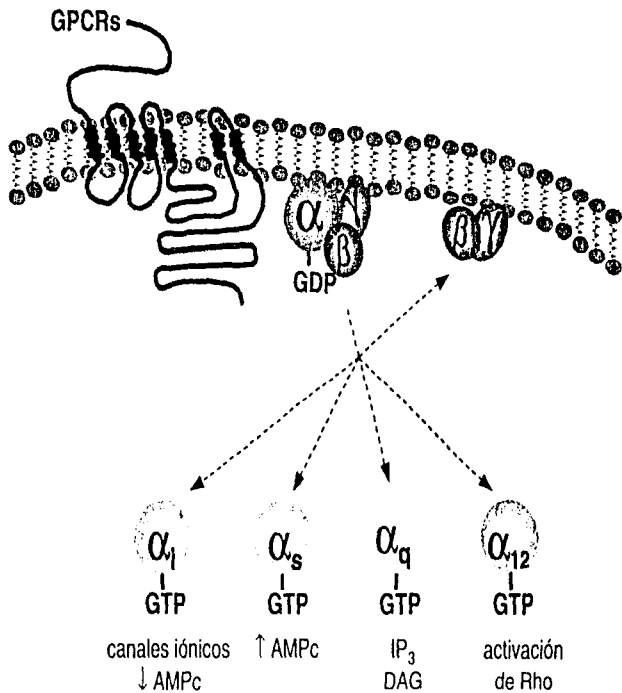


Fig. 2. Diferentes sistemas de transducción de los receptores acoplados a proteínas G.  
 AMPc, adenosin monofosfato ciclico;  $IP_3$ , inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol.



---

iniciada por un agonista y la fuerza de la propagación de esta señal depende de muchos factores, incluyendo los tipos y/o cantidades de los elementos transductores de la señal, constituidos por el receptor, la proteína G y los efectores (Birnbaumer, 1992; Hepler y Gilman, 1991; Lomasney *et al.*, 1991). Existen otros determinantes adicionales que incluyen la arquitectura celular y las proteínas accesorias que regulan eventos en las interfases receptor-proteína G o proteína G-efector.

De esta forma, la activación de los receptores de siete dominios transmembranales por su agonista, inicia una cascada de eventos que resulta no únicamente en la generación de la respuesta celular, sino además en un fino ajuste temporal de la respuesta del receptor mediante la activación de mecanismos moleculares y celulares que pueden llevar tanto a la desensibilización como a la resensibilización del receptor, términos que revisaré con detalle más adelante.

## PROTEÍNAS G

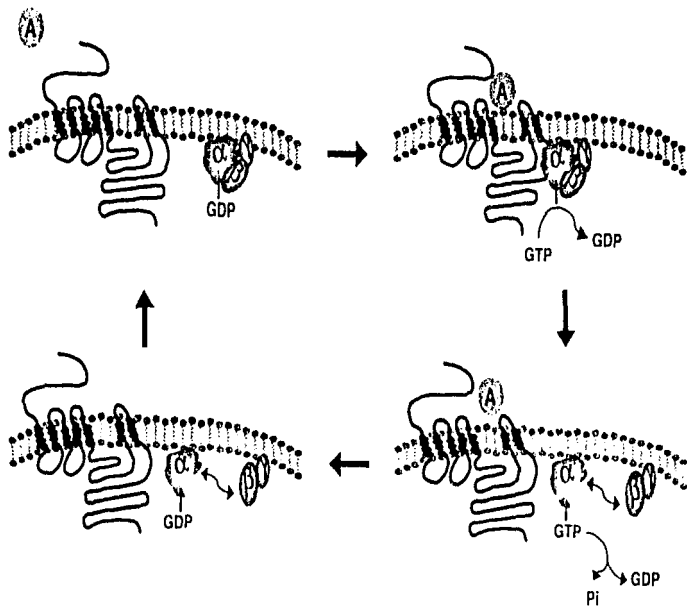
La activación vía agonista de los receptores acoplados a proteínas G induce un cambio conformacional de estos receptores formando un complejo receptor-agonista de alta afinidad. Dicho complejo interactúa entonces con proteínas

---

que unen nucleótidos de guanina, conocidas como proteínas G, que son proteínas heterotriméricas formadas por las subunidades  $\alpha$  (40-43 kDa),  $\beta$  (35 kDa) y  $\gamma$  (14 kDa) (Gilman, 1987).

Actualmente se conocen 4 grupos de estas proteínas:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  y  $G_{12}$ , los cuales se han clasificado con base en la homología de la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  (Hamm y Gilchrist, 1996; Nürnberg et al., 1995). De éstas, las proteínas  $G_s$  pueden ser modificadas de manera covalente por ADP-ribosilación en residuos de arginina por la toxina del cólera (Spiegel, 1995), mientras que las  $G_i$  son ADP-ribosiladas en residuos de cisteína por la toxina *pertussis* (Ui, 1984), por lo que ambas toxinas se utilizan como herramientas en el estudio de las vías de transducción de señales.

La subunidad  $\alpha$  se encuentra unida al dímero  $\beta\gamma$  y en su estado inactivo tiene unido GDP. La interacción de la proteína G con un receptor activado modifica la afinidad de la subunidad  $\alpha$  por el GDP, promoviendo el recambio de GDP por GTP y entonces la subunidad  $\alpha$  asume su conformación activa y se disocia del receptor y del dímero  $\beta\gamma$  (Birnbaumer y Birnbaumer, 1995). La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad  $\alpha$  le permite hidrolizar el GTP a GDP y de esta forma inactivarse. Una vez que el GTP es hidrolizado a GDP, la subunidad  $\alpha$  se reasocia con el dímero  $\beta\gamma$  y se puede unir nuevamente al receptor, quedando el sistema listo para responder a otro estímulo [Fig. 3]. Se ha observado que la



**Fig. 3. Modelo de activación para las proteínas G.**

En su estado basal, las proteínas G tienen unido GDP y se encuentran como heterotrimeros. Cuando el receptor es activado por su agonista (A) la subunidad  $\alpha$  se une a GTP, y las subunidades  $\beta\gamma$  se separan como un dímero. Una vez que el GTP es convertido a GDP mediante la actividad de GTPasa de la subunidad  $\alpha$ , se favorece la asociación del heterotrimer, quedando listo el sistema para un nuevo estímulo.

---

velocidad de hidrólisis del GTP varía sustancialmente de un subtipo de subunidad  $\alpha$  a otro (Carty *et al.*, 1990; Linder *et al.*, 1990), de tal forma que la hidrólisis del GTP es a su vez otro mecanismo que controla la duración del estado activo de las subunidades  $\alpha$  y del dímero  $\beta\gamma$ . Por otra parte, recientemente se describió un grupo de proteínas reguladoras de la actividad de GTPasa de la subunidad  $\alpha$ , denominado proteínas RGS, cuya importancia radica en que acelera la velocidad intrínseca de GTPasa, acortando la vida media del estado activo de la subunidad  $\alpha$  y modulando el ciclo de la proteína G en forma independiente del receptor (Ross, 1995; Berman y Gilman, 1998).

Las subunidades  $\alpha$  están compuestas por dos dominios principales: 1) el dominio de GTPasa, en el cual se encuentran un sitio de unión para nucleótidos de guanina, un sitio de unión para el receptor y un sitio de unión para el dímero  $\beta\gamma$  y 2) el dominio de  $\alpha$ -hélice que parece contribuir junto con el dominio de GTPasa en la unión de los efectores. Actualmente se conocen 23 diferentes subunidades  $\alpha$ , a las cuales se les ha asociado con la activación o inhibición de efectores tales como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C (Gilman, 1987) y los canales de calcio sensibles a voltaje (Kleuss *et al.*, 1993; Kleuss *et al.*, 1991).

Por su parte, el dímero  $\beta\gamma$  es un complejo proteínico que no tiene actividad intrínseca y que debido a la estrecha asociación entre cada una de sus subunidades se considera como una

---

unidad funcional, ya que sus componentes solamente pueden disociarse *in vitro* bajo condiciones desnaturalizantes. Se han descrito 5 diferentes tipos de la subunidad  $\beta$  y 11 de la subunidad  $\gamma$ . Como ya se mencionó, el complejo  $\beta\gamma$  no presenta actividad intrínseca; sin embargo, se le ha asociado con diversas funciones fundamentales en los procesos de transducción de las señales: se le asocia con la activación de la fosfolipasa  $C\beta 3$  (Carozzi *et al.*, 1993), con la activación (Chen *et al.*, 1995) o inhibición (Tang y Gilman, 1991) de algunos tipos de la adenilato ciclasa, y con la activación de canales de  $K^+$  (Yamada *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1989). Así mismo, se sabe que el dímero  $\beta\gamma$  puede llevar a la activación de diversas proteínas cinasas, entre las que se encuentran: la fosfatidilinositol 3-cinasa (Morris *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995), algunas cinasas de residuos de tirosina como la Tsk, la Btk y la Pyk2 (Tsukada *et al.*, 1994; Langhans-Rajasenkarán *et al.*, 1995; Lev *et al.*, 1995), las cinasas específicas para los receptores acoplados a proteínas G (GRK2 y GRK3), las cuales se pueden unir a la membrana celular a través del dímero  $\beta\gamma$  (Lohse, 1993), y la cinasa activada por mitógenos (MAPK) (Luttrell *et al.*, 1996).

Es interesante observar que muchos de los efectores de las proteínas G son compartidos entre las subunidades  $G\beta\gamma$  y  $G\alpha$  (Tabla I). Por tanto, podríamos decir que el complejo  $G\beta\gamma$  es tan efectivo como la subunidad  $G\alpha$  en transmitir la señal de un

receptor al interior de la célula y, en ciertas instancias, puede de hecho ser el transductor primario.

**Tabla I. Efectores de las proteínas G heterotriméricas**

SUBUNIDAD	EFFECTORES
$G\alpha_s$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todas las isoformas de la adenilato ciclasa</li> <li>• Canales de <math>Ca^{2+}</math> sensibles a voltaje</li> </ul>
$G\alpha_i$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenilato ciclasa tipos 5 y 6</li> <li>• Canales de <math>K^+</math></li> <li>• Fosfatidilinositol 3-cinasa-<math>\gamma</math> (PI3K<math>_{\gamma}</math>)</li> <li>• Fosfodiesterasa de GMP cíclico</li> </ul>
$G\alpha_q$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfolipasa C<math>\beta</math> (PLC<math>\beta</math>)</li> <li>• Proteína cinasa C (PKC)</li> <li>• Tirosina cinasa de Bruton (BTK)</li> </ul>
$G\alpha_{12}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P115RhoGEF</li> </ul>
$G\beta\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfolipasa C<math>\beta</math> (PLC<math>\beta</math>)</li> <li>• Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)</li> <li>• Adenilato ciclasa tipos 1, 2, 4, y 7</li> <li>• Cinasa del receptor <math>\beta</math>-adrenérgico (<math>\beta</math>ARK)</li> <li>• Fosducina</li> <li>• Canales de <math>K^+</math>, <math>Ca^{2+}</math>, y <math>Na^+</math></li> <li>• Familia de cinasas Src</li> <li>• Familia de cinasas BTK/Tec</li> <li>• Miembros de la familia Rho</li> </ul>

Las consecuencias bioquímicas y biológicas de tal diversidad en la composición de subunidades de las proteínas G y la especificidad de acoplamiento para cada receptor, han empezado a ser dilucidadas orientando los estudios al esclarecimiento de los mecanismos de acción de estos

---

efectores, que trabajando en conjunto llevan a una fina regulación de la actividad de un receptor, de sus vías de señalización y de las respuestas celulares.

### **MECANISMOS DE REGULACIÓN**

A la fecha se han descubierto numerosos mecanismos mediante los cuales se puede regular la actividad de los receptores acoplados a proteínas G. Entre estos mecanismos se encuentran desde aquellos que operan al nivel de transcripción y de traducción, hasta aquellos mecanismos que actúan al nivel de proteína regulando la velocidad de degradación de los receptores. En otro grupo de mecanismos se encuentran aquellos mediante los cuales los receptores son regulados a través de modificaciones covalentes, así como también los que regulan la asociación del receptor con otras proteínas y su localización subcelular (Hausdorff *et al.*, 1990; Ferguson *et al.*, 1996; Koenig y Edwardson, 1997). A continuación describiré con detalle este último grupo de mecanismos por ser importantes para la comprensión del presente estudio.

---

---

## DESENSIBILIZACIÓN

Al responder selectivamente a un nuevo o creciente estímulo, los sistemas biológicos habitualmente disminuyen su capacidad de respuesta ante un estímulo estable o persistente mediante un proceso llamado desensibilización o adaptación. La desensibilización se manifiesta en el ámbito celular en procesos biológicos tan diversos como son la quimiotaxis bacteriana (Springer *et al.*, 1979), la respuesta de apareamiento en levaduras (Reneke *et al.*, 1988), la percepción de luz en *Drosófila* (Dolph *et al.*, 1993), la neurotransmisión en mamíferos (Arriza *et al.*, 1992), etc.

De las diferentes formas de regulación a las que están sometidos los receptores acoplados a proteínas G, ninguna ha recibido tanta atención como lo ha sido el proceso de desensibilización. Este proceso se ha dividido en varios niveles: en desensibilización homóloga o específica de agonista y en desensibilización heteróloga o no específica de agonista; en rápida (segundos a minutos) o lenta (horas a días); y como pérdida de la función del receptor (desacoplamiento) o como una disminución en el número de receptores (proceso conocido como "down regulation", que indica degradación de los receptores).



---

Como ya señalé, la desensibilización de los GPCRs puede dividirse, dependiendo de la naturaleza del estímulo, en desensibilización homóloga o heteróloga. La primera se caracteriza por la pérdida o disminución en la respuesta del receptor únicamente al agente desensibilizante (o agonista específico); mientras que la desensibilización heteróloga se caracteriza por una disminución en la respuesta a múltiples estímulos, promovida por la exposición a un agonista o ligando inespecífico. De lo anterior se desprende que la desensibilización heteróloga implica que una hormona puede atenuar la respuesta de otra hormona para un receptor distinto que actúa ya sea a través del mismo o de un diferente sistema de transducción.

La pérdida o disminución de la respuesta del receptor durante el proceso de desensibilización se debe a que ocurre un desacoplamiento funcional entre el receptor y la proteína G, lo que se percibe como una reducción en la sensibilidad del receptor al efecto máximo del agonista.

La desensibilización de la respuesta a la luz por el fotorreceptor rodopsina y de la respuesta hormonal por el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico han sido los modelos mejor estudiados para este fenómeno (Hausdorff *et al.*, 1990; Hargrave y McDowell, 1992). Debido a que la rodopsina está disponible en mayor cantidad que cualquier otro receptor acoplado a proteínas G, mucho del conocimiento que se tiene acerca del

---

fenómeno de desensibilización proviene de estudios realizados con rodopsina. Inicialmente se observó que para percibir los continuos cambios de luz que se presentan en el medio ambiente, los fotorreceptores debían recuperarse de una primera activación por luz y así estar listos para una subsecuente estimulación. Para ello, la célula había desarrollado un rápido mecanismo de recambio, el cual permitía que se llevara a cabo la fototransducción. Así, se observó que la desensibilización de la rodopsina ocurría en menos de un segundo después de la estimulación con luz (Schleicher, *et al.*, 1989), respondiendo de este modo a un nuevo destello de luz de una iluminación que está siendo continuamente percibida.

En cuanto al receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, este fue uno de los primeros receptores acoplados a proteínas G no visuales en ser purificado en cantidades substanciales, y también mostró sufrir una muy marcada desensibilización. En un lapso de apenas algunos segundos después de la exposición al agonista- $\beta$ , ocurría un incremento en la concentración de AMP-cíclico, pero este incremento permanecía constante o regresaba a niveles cercanos al basal en cuestión de minutos (Shear *et al.*, 1976; Su *et al.*, 1979; Sibley *et al.*, 1987).

La desensibilización del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico se demostró en preparaciones de membranas plasmáticas obtenidas de células desensibilizadas, al observar que éstas exhibían una considerable disminución en la actividad de la

adenilato ciclasa después de haber dado un segundo estímulo con el agonista. También se observó que el rápido decremento en la actividad de la adenilato ciclasa ocurría sin observar cambios en la habilidad para activar directamente a la proteína G, indicando que la adaptación no ocurría al nivel de la proteína G. Se postuló entonces que la desensibilización ocurría mediante una vía que alteraba al receptor mismo, puesto que al estudiar receptores  $\beta$ -adrenérgicos desensibilizados purificados de eritrocitos de pavo, se encontró que dichos receptores mostraban una capacidad reducida para estimular a la adenilato ciclasa, cuando éstos se probaban en sistemas reconstituidos (Strulovici *et al.*, 1984).

## FOSFORILACIÓN

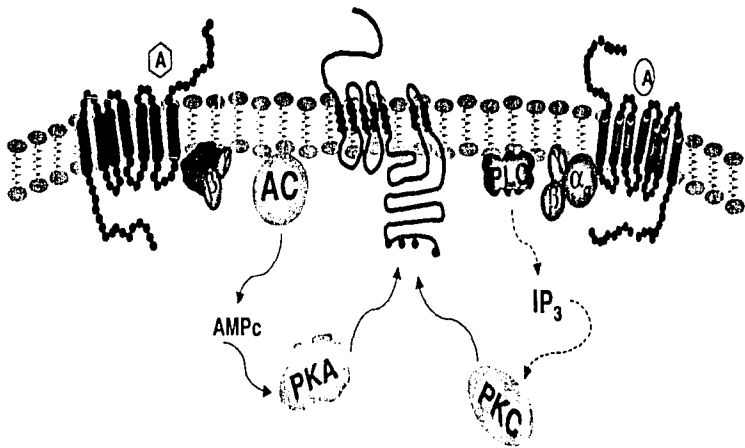
La desensibilización de los receptores de siete dominios transmembranales ocurre inicialmente a partir de su fosforilación. Actualmente se sabe que en este proceso participan como principales moduladores tres grupos de proteínas cinasas: (1) las proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros, como son la proteína cinasa A y la proteína cinasa C (PKA y PKC, respectivamente) (Clark *et al.*, 1988; Houslay, 1991), (2) las proteínas cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (conocidas como GRKs por sus siglas

---

en inglés "G-protein-coupled-Receptor Kinases) (Ferguson *et al.*, 1997; Krupnick *et al.*, 1998), y (3) algunos receptores con actividad intrínseca de cinasa de residuos de tirosina (Hadcock *et al.*, 1992). Estas moléculas reguladoras pueden modificar tanto el estado funcional de los receptores acoplados a proteínas G, como la distribución celular de los mismos (esto es, internalización y reciclaje; términos que detallaré más adelante), debido a que estos eventos están regulados en gran parte por procesos de fosforilación y desfosforilación, donde además participan otro tipo de proteínas adaptadoras que revisaré en su momento.

## **DESENSIBILIZACIÓN HETERÓLOGA**

Alternativamente, la desensibilización de la respuesta a un determinado agonista puede tener lugar por la exposición de la célula a agonistas para distintos receptores, en un proceso llamado desensibilización heteróloga. Dicho proceso afecta potencialmente múltiples sistemas de señalización, involucrando fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G. Este proceso está mediado por cinasas dependientes de segundos mensajeros, como son: la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), que es activada por receptores acoplados a proteínas G del tipo Gs, y la proteína cinasa C (PKC), la cual es



**Fig. 4. Modelo de desensibilización heteróloga para receptores acoplados a proteínas G.**  
 La desensibilización heteróloga involucra la fosforilación de los receptores mediada por proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros, como son la PKA y la PKC.  
 A, agonista; AC, adenilato ciclasa; AMPc, adenosin monofosfato cíclico; PKA, proteína cinasa A;  
 PLC, fosfolipasa C; IP<sub>3</sub>, inositol trisfosfato; PKC, proteína cinasa.

---

activada por receptores acoplados a proteínas Gq. Se ha observado que la fosforilación de los receptores mediada por estas cinasas reduce su habilidad para estimular a sus proteínas G correspondientes (Benovic *et al.*, 1985; Pitcher *et al.*, 1992) [Fig. 4]. De los estudios realizados a la fecha, se sabe que la acción de la PKA y de la PKC pueden ocasionar una significativa pérdida de la función de los receptores fosforilados y que dichas cinasas fosforilan a los receptores en sitios diferentes a los de las GRKs (Lefkowitz *et al.*, 1990).

En la mayoría de los casos, la fosforilación de los GPCRs por este tipo de cinasas no parece estar influida por la unión del agonista al receptor. Por ejemplo, existen datos que sugieren que cualquier situación que genere un incremento en la concentración intracelular de AMP cíclico da como resultado la fosforilación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos mediada por la PKA, provocando el desacoplamiento entre el receptor y la proteína G (Lohse, *et al.*, 1990 y 1992). De los estudios realizados con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, que ha sido el sistema más estudiado, se sabe que la fosforilación ocurre en residuos de serina localizados en la tercera asa citoplásmica, o en el carboxilo terminal del receptor (Bouvier *et al.*, 1988; Hausdorff *et al.*, 1989).

En cuanto a la participación de la PKC, está claro que diversos GPCRs son fosforilados por esta cinasa cuando ésta ha sido activada de manera heteróloga. Por ejemplo, los

---

receptores  $AT_{1A}$  para angiotensina que son fosforilados por PKC en células HEK 293 (Daaka, *et al.*, 1998). Así también, se ha observado que la activación de receptores no adrenérgicos puede llevar a la desensibilización heteróloga del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (Leeb-Lundberg *et al.*, 1987). Al respecto, en nuestro laboratorio se demostró que, en fibroblastos rat-1, la endotelina, a través de sus receptores  $ET_A$ , induce la fosforilación y desensibilización de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos, participando la proteína cinasa C y al parecer alguna proteína cinasa de residuos de tirosina (Vázquez-Prado *et al.*, 1997).

### DESENSIBILIZACIÓN HOMÓLOGA

Como mencioné anteriormente, la desensibilización homóloga depende estrictamente del agonista. En este fenómeno se puede observar en un corto periodo de tiempo, que puede ir desde milisegundos hasta minutos después del estímulo con el agonista, que las células disminuyen o virtualmente eliminan la respuesta evocada por el agonista (Lohse *et al.*, 1992; Attramadal *et al.*, 1992; Schleicher *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995b), en un proceso que involucra la fosforilación, mediada por GRKs, de residuos en uno o más dominios intracelulares de los receptores específicamente ocupados por

---

su agonista. Ello promueve la unión de unas proteínas llamadas arrestinas (Lohse *et al.*, 1990; Attramadal *et al.*, 1992). La unión de las arrestinas a receptores fosforilados tiene dos funciones, primero provoca que el receptor se desacople de su proteína G, llevando así a una disminución en la respuesta del receptor (Lohse *et al.*, 1990; Attramadal *et al.*, 1992) y segundo, inicia el proceso de internalización del receptor, al promoverse la unión de moléculas de clatrina (Ferguson *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1996).

El hecho de que el receptor se encuentre ocupado por su agonista implica un cambio en la conformación del receptor (Samama *et al.*, 1993), convirtiéndose de esta forma en blanco para las GRKs, las cuales pueden interactuar con el receptor exclusivamente cuando éste se encuentra ocupado por su agonista y así fosforilar regiones del receptor que quedan expuestas después de su activación con el agonista. Existen evidencias que indican que las GRKs interactúan con el receptor en sitios distintos a sus sitios de fosforilación, y que dichos sitios son los principales responsables de mediar la interacción entre el receptor y la GRK.

El actual modelo de acción de las GRKs propone que un receptor fosforilado por una GRK puede secuencialmente unir de forma estequiométrica a otra proteína citoplásmica conocida como arrestina (en el caso de la retina) (Smith *et al.*, 1994; Craft y Whitmore, 1995) o  $\beta$ -arrestina-1 (Lohse *et al.*, 1990b;

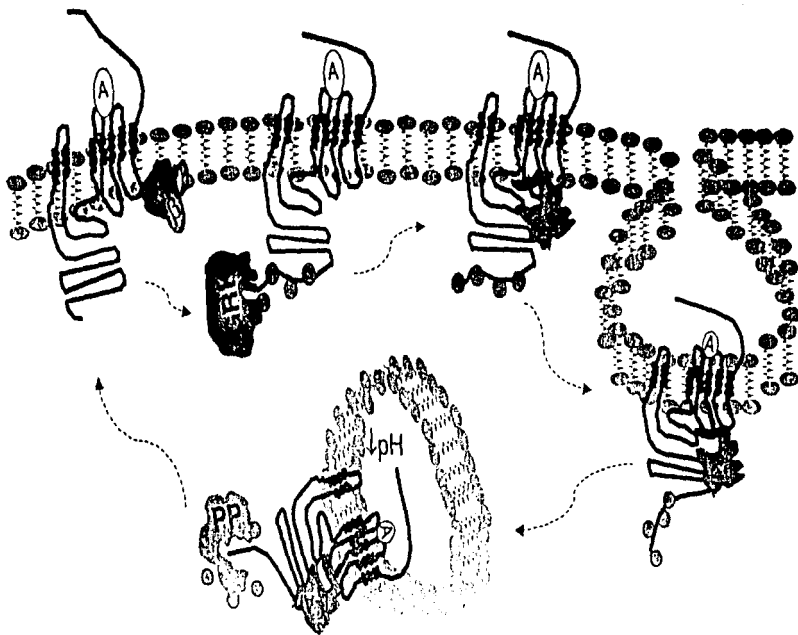


---

Parruti *et al.*, 1993; Sterne *et al.*, 1993) y  $\beta$ -arrestina-2 (Attramadal *et al.*, 1992; Sterne *et al.*, 1993) (en tejidos extrarretinales). Como resultado de la unión de estas proteínas, el receptor queda inhabilitado para activar a su proteína G y, por tanto, a sus efectores, generándose así el bloqueo de la respuesta del receptor, es decir, su desensibilización [Fig. 5]. Además, como ya mencioné, la unión de las  $\beta$ -arrestinas al complejo receptor/GRK parece iniciar un proceso de endocitosis o internalización de los receptores (Ferguson *et al.*, 1996b) en endosomas reciclables (von y Kobilka, 1992). Una vez que los receptores acoplados a proteínas G han sido endocitados, éstos pueden ser desfosforilados por una proteína fosfatasa asociada a la membrana (Pitcher *et al.*, 1995) en un proceso de resensibilización, lo que les permite regresar a la superficie celular en una conformación lista para poder responder a un nuevo estímulo, proceso que revisaré más adelante.

## LA FAMILIA DE LAS GRKS

Las observaciones iniciales de que la fosforilación de la rodopsina, o del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, iniciaba su desensibilización llevaron a la identificación de las GRKs, una familia de cinasas de residuos de serina y treonina, la cual comprende actualmente seis miembros. Estas proteínas se han



**Fig. 5. Modelo de Desensibilización Homóloga e Internalización de los Receptores Acoplados a Proteínas G.** La desensibilización heteróloga involucra la fosforilación de los receptores mediada por GRKs y la unión de arrestinas ( $\beta$ -Arr), resultando finalmente en la internalización del receptor, donde es desfosforilado por la proteína fosfatasa (PP).

agrupado de acuerdo a su homología en su secuencia de aminoácidos y a su similitud funcional, en: 1) GRK1 (cinasa de la rodopsina) (Lorenz *et al.*, 1991); 2) GRK2 (referida como  $\beta$ ARK1, cinasa-1 del receptor  $\beta$ -adrenérgico) (Benovic *et al.*, 1989) y GRK3 (referida como  $\beta$ ARK2, cinasa-2 del receptor  $\beta$ -adrenérgico) (Benovic *et al.*, 1991); y 3) una subfamilia GRK4, compuesta por los siguientes miembros: GRK4 (IT-11) (Ambrose *et al.*, 1992), GRK5 (Kunapuli y Benovic, 1993, Premont *et al.*, 1994) y GRK6 (Benovic y Gomez, 1993).

Estas cinasas fosforilan a los GPCRs en residuos de serina y treonina que se localizan ya sea en el extremo carboxilo-terminal (en el caso de la rodopsina y del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico) o en la tercera asa intracelular del receptor (por ejemplo en el caso del receptor muscarínico  $M_2$ ). El dominio catalítico de cada una de estas cinasas se encuentra flanqueado por aproximadamente unos 185 aminoácidos del dominio amino-terminal y se considera un sitio importante para el reconocimiento del receptor, cuando éste se encuentra en forma activada. También se ha demostrado que existe un dominio localizado en el carboxilo-terminal de las GRKs que es importante para la unión de estas cinasas con la membrana plasmática (Premont *et al.*, 1995).

Se sabe que las GRKs se expresan de manera ubicua (Freedman y Lefkowitz *et al.*, 1996) (Tabla II). En células no estimuladas, las GRK1, GRK2 y GRK3 se localizan

predominantemente en el citoplasma y llegan a asociarse con la membrana plasmática después de la activación del receptor, mientras que GRK4, GRK5 y GRK6 exhiben una sustancial localización en la membrana, en ausencia de algún estímulo por agonista (Premont *et al.*, 1995).

**Tabla II. Propiedades moleculares de las GRKs**

Familia	Nombre común	Asociación a la membrana	Distribución	Características de regulación
GRK1	RK	Farnesilación	Retina	Autofosforilación
GRK2	$\beta$ ARK1	G $\beta$ y, PL	Ubícua	Dominios PH, PKC, calmodulina
GRK3	$\beta$ ARK2	G $\beta$ y, PL	Ubícua	Dominios PH
GRK4	IT-11	Palmitoilación	Testículos	4 variantes por splicing
GRK5		PL	Ubícua	Autofosforilación, PKC, calmodulina
GRK6		Palmitoilación	Ubícua	Calmodulina

RK, rodopsina cinasa; PL, fosfolípidos.

La asociación de las GRKs con la membrana plasmática, mediada por la porción carboxilo terminal de cada uno de los miembros de la familia de las GRKs, involucra diferentes mecanismos. Estos mecanismos incluyen farnesilación del carboxilo-terminal en el caso de la GRK1 (Anant y Fung, 1992; Inglese *et al.*, 1992); interacciones con las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G (Haga y Haga, 1992; Pitcher *et al.*, 1992b; Kim *et al.*, 1993) y con fosfolípidos (DebBurman *et al.*, 1995; Onorato *et al.*, 1995; Pitcher *et al.*, 1995b; DebBurman *et al.*, 1996), vía un

---

dominio PH (denominado así por su homología con la proteína plaquetaria plectrina) (Koch *et al.*, 1993) para el caso de las GRK2 y GRK3; palmitoilación de proteínas en el caso de la GRK4 (Premont *et al.*, 1996) y de la GRK6 (Stoffel *et al.*, 1994); e interacciones electrostáticas entre aminoácidos altamente básicos del carboxilo-terminal y fosfolípidos de membrana para la GRK5 (Kunapuli *et al.*, 1994; Pitcher *et al.*, 1996).

Existen otros factores que regulan la actividad de las GRKs, los cuales involucran regulación por proteínas con actividad de cinasas, incluyendo PKC (Chuang *et al.*, 1995; Winstel *et al.*, 1996) y proteínas que unen calcio, tales como la recoverina (Chen *et al.*, 1995c) y la calmodulina (Pronin *et al.*, 1997; Chuang *et al.*, 1996).

## **LAS ARRESTINAS**

Por otra parte, los primeros estudios sobre la desensibilización de la rodopsina y del receptor  $\beta$ -adrenérgico indicaron que aunque la fosforilación mediada por GRKs contribuía a la desensibilización del receptor, ésta no era suficiente para la inactivación total del receptor bajo condiciones fisiológicas. Lo anterior indicaba que algún otro componente era requerido, además de la fosforilación mediada por GRKs, para apagar la transducción de la señal

activada por un receptor acoplado a proteínas G. La existencia de una proteína "secuestrante" fue primeramente identificada por experimentos que demostraban la unión de una proteína soluble de 48 kDa a la rodopsina fosforilada, la cual fue denominada más tarde como arrestina visual (Kuhn *et al.*, 1984; Wilden *et al.*, 1986); posteriormente, experimentos *in vitro* sugirieron que para obtener la desensibilización total del receptor  $\beta$ -adrenérgico también se requería de una proteína similar a la arrestina (Benovic *et al.*, 1987), la  $\beta$ -arrestina.

Ahora se sabe que las arrestinas son una clase de proteínas solubles que trabajan junto con las GRKs para detener la señalización intracelular de un receptor. Se sabe que las arrestinas, además de ser requeridas para apagar totalmente la señal de un receptor, se requieren también para acelerar el proceso de resensibilización. Entonces, en la presencia continua de un estímulo, las arrestinas aseguran que cada receptor activado podrá ser inactivado para iniciar nuevamente la transducción de una señal.

La familia de las arrestinas incluye a la fecha seis miembros, varios de los cuales sufren "splicing" alternativo (Ferguson *et al.*, 1996; Sterne-Marr y Benovic, 1995). Algunas de estas proteínas se expresan de manera ubícua, encontrándose en el cerebro y en otros tejidos (como son las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2), mientras que otras están confinadas a la retina (como son las arrestinas visuales y la arrestina de los conos).

---

El hecho de que las arrestinas puedan discriminar entre el estado activo y el inactivo de los receptores acoplados a proteínas G, sugirió que estas moléculas contenían uno o más dominios que les permitían contactar específicamente aquellas regiones de los receptores que manifiestan su estado de activación (las cuales parecen encontrarse en el dominio citoplasmático de los receptores). La localización de esta región en las arrestinas, denominada "región de reconocimiento de activación", mostró estar en el dominio amino-terminal. A la fecha se sabe que son al menos tres regiones, las cuales se encuentran a la mitad del dominio amino-terminal (Gurevich *et al.*, 1993; Gurevich *et al.*, 1995a), las que están involucradas en el reconocimiento del estado de activación de los receptores.

De igual forma, la habilidad de las arrestinas para discriminar entre los estados fosforilado y no fosforilado del receptor, indicó que podría existir también una región o regiones en las arrestinas, que podían contactar la porción fosforilada del receptor después de su activación por el agonista. Inicialmente se postuló que esta región, denominada "región de reconocimiento de fosforilación", era una región catiónica, puesto que la heparina y otros polianiones competían eficientemente con la rodopsina (activada por luz) por la unión de la arrestina (Palczewski *et al.*, 1991). Posteriormente se estableció que esta región se localiza en un discreto dominio en el amino-terminal (Kieselbach *et al.*, 1994). Dicho dominio se

localiza entre los residuos 158 y 185 (Gurevich y Benovic, 1993), donde se han identificado varios residuos básicos que son críticos para la interacción con fosfatos (Gurevich *et al.*, 1995b). Por otra parte, se observó que la proteólisis del carboxilo terminal de la rodopsina fosforilada reducía la interacción de un péptido de la arrestina que comprendía los residuos 170-182, lo cual indicó que esta región de la arrestina interaccionaba con el carboxilo-terminal de la rodopsina fosforilada (Kieselbach *et al.*, 1994). También se sabe actualmente que las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 contienen en su carboxilo terminal un dominio de unión para una proteína llamada clatrina, la cual también participa en el proceso de internalización de los GPCRs.

El papel funcional de las arrestinas en la desensibilización homóloga de los receptores acoplados a proteínas G *in vivo* ha sido ilustrado por varios estudios en células intactas. Podemos mencionar, por ejemplo, que la co-expresión de la  $\beta$ -arrestina o arrestina-3 incrementa la desensibilización de los receptores  $\beta_2$ - (Pippig *et al.*, 1993),  $\beta_1$ - (Freedman *et al.*, 1995), y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos (Diviani *et al.*, 1996); por otro lado, la co-expresión de la  $\beta$ -arrestina y de la  $\beta$ ARK incrementa la desensibilización de los receptores muscarínicos m2 (Schlador, *et al.*, 1997), mientras que la sobre expresión sólo de la  $\beta$ -arrestina con el receptor m2, en células JEG-3, no provoca un aumento en la desensibilización del receptor, lo que nos indica el requerimiento de las GRKs.



---

## INTERNALIZACIÓN DE LOS GPCRs

Otro importante nivel de regulación al que están sometidos los receptores acoplados a proteínas G es su endocitosis, internalización o secuestro que sufren una vez que han sido activados por su agonista (Koenig y Edwardson, 1997). Numerosos estudios han demostrado que la activación por el agonista promueve la translocación de los GPCRs de la superficie celular a un compartimiento intracelular. El significado funcional y los mecanismos involucrados en la internalización de los GPCRs han estado sujetos a intensos estudios y controversias durante años. Inicialmente se pensó que la internalización de los receptores podía contribuir a una desensibilización más rápida. Más tarde se demostró que el rápido desacoplamiento funcional de los receptores no requería de este proceso. Posteriormente, la internalización de los receptores fue vista como una etapa temprana del proceso llamado "down regulation" de los receptores, el cual ocurría después de una prolongada estimulación de los receptores con su agonista (horas a días), y que finalmente terminaba en la degradación de los mismos dentro de lisosomas. Sin embargo, recientemente han surgido otros dos importantes papeles para este proceso: resensibilización y señalización de los mismos receptores.

---

En los primeros estudios realizados con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico descubrieron que ocurría una rápida redistribución de los receptores al observar que, en eritrocitos de rana búfalo tratados con agonista, se presentaba un decremento en el número de receptores de la superficie celular acompañada de un considerable incremento de los mismos dentro de la célula (Chuang y Costa, 1979). Por otra parte, los primeros estudios de unión de ligando con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico mostraron una progresiva pérdida en la afinidad del receptor para unir al agonista durante el curso del ensayo, lo cual sugirió una pérdida en el número de los receptores de la membrana plasmática (Pittman y Molinoff, 1980; Toews *et al.*, 1983). Más tarde, se encontró que los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos secuestrados estaban asociados a una fracción de "vesículas ligeras" que pudieron ser separadas de la fracción de "vesículas pesadas" (es decir, pertenecientes a la membrana plasmática) (Harden *et al.*, 1980).

Los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos secuestrados mostraban una reducida afinidad por los agonistas y una incapacidad para acoplarse a sus proteínas G (Harden *et al.*, 1980). La translocación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos de la membrana plasmática a compartimientos intracelulares ocurría muy rápidamente (Waldo *et al.*, 1983). El secuestro de estos receptores era al parecer independiente del acoplamiento entre el receptor y la proteína G (Clark *et al.*, 1985), y el único

---

requerimiento parecía ser la ocupación del receptor por su agonista, puesto que se observó una correlación entre la cantidad de receptores ocupados por el agonista y la cantidad de receptores secuestrados al interior de la célula (Lohse *et al.*, 1990).

### **LAS $\beta$ -ARRESTINAS Y LAS GRKs EN LA INTERNALIZACIÓN DE LOS GPCRs**

Diversas líneas de investigación ahora indican que la fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G mediada por las GRKs, y seguida por la unión de las  $\beta$ -arrestinas, son etapas cruciales en la internalización de varios de los receptores de siete dominios transmembranales (Ferguson *et al.*, 1996). Por ejemplo, en el caso de los receptores muscarínicos m2 en células COS, se observa un incremento en su internalización cuando se sobre expresa la GRK2, mientras que con una forma dominante negativa de la GRK2 la internalización se retarda (Tsuga *et al.*, 1994). Observaciones similares se encontraron con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, al no ser secuestrado cuando se utilizaba una mutante del receptor, el cual representaba un sustrato pobre para la  $\beta$ ARK; el secuestro de este receptor se recuperaba al sobre expresar a la  $\beta$ ARK (Ferguson *et al.*, 1995).

---

Por otra parte, también se observó que la sobre expresión de la  $\beta$ -arrestina incrementaba la desensibilización del receptor muscarínico m2 (Schlador y Nathanson, 1997), mientras que otros resultados sugerían que el receptor muscarínico m2, en células HEK, era internalizado en forma independiente de arrestinas y no requería de dinamina (una proteína que recientemente ha sido identificada como un componente crítico requerido en las primeras etapas de la endocitosis mediada por vesículas cubiertas de clatrina, Pals-Rylaarsdam y Hosey, 1997).

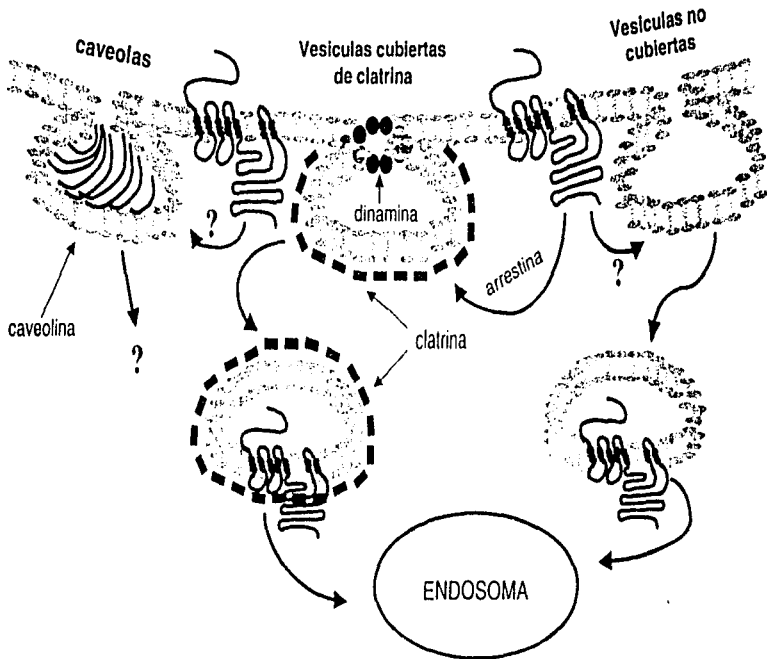
El modelo que actualmente se sugiere para la regulación de la respuesta de los receptores miembros de la familia de los GPCRs es el prototipo para el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico [Fig. 5]. En este modelo, la activación del receptor no sólo lleva a la señalización, sino que también se promueve la desensibilización del receptor dependiente de agonista, como consecuencia de la fosforilación por las GRKs y de la unión de las  $\beta$ -arrestinas. Cuando las  $\beta$ -arrestinas se unen promueven la movilización del receptor por endocitosis. Subsecuentemente, después de la acidificación en los endosomas, los receptores pueden llegar a ser desfosforilados y entonces ser reciclados de vuelta a la membrana, ahora como receptores funcionales.

Sin embargo, existen experimentos en diferentes tipos de células y con diferentes receptores que sugieren la existencia de otros mecanismos para la internalización de los GPCRs. Por

---

ejemplo, en estudios realizados con los receptores muscarínicos m1, m3, y m4, en células HEK, se observó que estos receptores eran internalizados mediante un mecanismo independiente de arrestinas, pero dependiente de dinamina. Por otro lado, se demostró que la dinamina era importante para la movilización de los receptores localizados en invaginaciones de la membrana llamadas caveolas, tal es el caso de los receptores para angiotensina AT<sub>1A</sub> cuya internalización puede estar mediada ya sea por caveolas o por vesículas no cubiertas con clatrina (Chen *et al.*, 1993). Sin embargo, la observación de otro tipo de movilización de los receptores AT<sub>1A</sub>, mediante un mecanismo dependiente de dinamina cuando se sobre expresa la  $\beta$ -arrestina (Chen *et al.*, 1993) sugiere que existe una plasticidad en la elección de la vía endocítica utilizada por los GPCRs. La elección de las vías parece depender tanto de las determinantes específicas del receptor como del ambiente celular en el cual se expresa dicho receptor.

En resumen, estos hallazgos sugieren que existen 3 distintos mecanismos para la internalización de los GPCR [Fig. 6], los cuales pueden actuar a través de vías dependientes o independientes de dinamina. En la vía dependiente de dinamina, la internalización puede ocurrir a través de las arrestinas mediante vesículas cubiertas con clatrina. En la vía independiente de dinamina existen dos mecanismos, uno donde el receptor es dirigido, mediante un mecanismo



**Fig. 6.** Representación esquemática de los diferentes mecanismos para la internalización de los receptores acoplados a proteínas G.

---

desconocido, directamente hacía las caveolas o bien permitiendo que los receptores interaccionen directamente con caveolina en estas estructuras membranales; mientras que en el otro mecanismo los receptores acoplados a proteínas G son internalizados de forma totalmente independiente de la dinamina, en vesículas no cubiertas de clatrina (Bünemann *et al.*, 1999).

### INTERNALIZACIÓN Y DESENSIBILIZACIÓN.

Nuevamente por estudios realizados con los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, se propuso originalmente que el secuestro de estos receptores era un mecanismo para su desensibilización, basándose en la observación de que los receptores secuestrados contenidos en la fracción ligera de membranas no presentaban proteínas Gs (Waldo *et al.*, 1983). Sin embargo, se observó que la inyección intraperitoneal de isoproterenol en ratas generaba una rápida desensibilización del receptor  $\beta$ -adrenérgico acompañada por una translocación de ~40% de los receptores de la membrana plasmática a la fracción vesicular (Strasser *et al.*, 1984). Finalmente, aplicando inhibidores a células A431 permeabilizadas, Lohse y colaboradores (Lohse *et al.*, 1990) demostraron que el secuestro de los receptores  $\beta_2$ -

---

adrenérgicos contribuía solamente con ~20-30% en la desensibilización de este receptor.

Aunque hay estudios que muestran que el secuestro de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos está asociado con su desensibilización inducida por agonista, es claro que el proceso de internalización no explica totalmente el proceso de desensibilización. Por ejemplo, al inhibir la internalización mediada por vesículas cubiertas con clatrina de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos no se observa inhibición alguna en su desensibilización mediada por agonista (Wakshull *et al.*, 1985; Homburger *et al.*, 1980; Chuang *et al.*, 1980; Hertel *et al.*, 1985; Pippig *et al.*, 1995). Además, varios estudios demuestran que la desensibilización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ocurre más rápidamente que su internalización (Toews *et al.*, 1984; Waldo *et al.*, 1983; Roth *et al.*, 1991).

Por otra parte, existen estudios que sugieren que la internalización de otros GPCRs sí contribuye a su desensibilización; por ejemplo, la mutación de residuos de treonina del carboxilo terminal en el receptor muscarínico m3 daña severamente su internalización y su capacidad para desensibilizarse (Yang *et al.*, 1995). La mayoría de los estudios, sin embargo, indican que estos dos fenómenos son distintos debido a que los procesos de desensibilización e internalización son independientes, como lo demuestran estudios realizados con los receptores AT<sub>1A</sub> para angiotensina (Thomas *et al.*, 1995), D1 para



---

dopamina (Ng GYK *et al.*, 1995), H2 para histamina (Fukushima *et al.*, 1997), m2 muscarínico (Pals-Rylaarsdam *et al.*, 1995), para secretina (Holtmann *et al.*, 1996) y para neurocinina I (Garland *et al.*, 1996).

## INTERNALIZACIÓN Y RESENSIBILIZACIÓN.

Aunque la internalización de los GPCRs puede no ser esencial para la desensibilización inducida por agonista, estudios recientes indican que la internalización de los GPCRs tiene un importante papel al acelerar la recuperación de la funcionalidad, en un proceso comúnmente referido como "resensibilización".

El rápido proceso de desensibilización es también, en general, rápidamente reversible. Se observó que después de remover al agonista isoproterenol del contacto con las células, la actividad de la adenilato ciclasa generalmente regresaba a niveles normales en un tiempo de entre 15 a 30 minutos. En cuanto a los mecanismos involucrados en este proceso de resensibilización, Sibley y colaboradores (Sibley *et al.*, 1986) sugirieron que la internalización del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico jugaba un importante papel en la desfosforilación y resensibilización del receptor. Posteriormente se observó que después de la estimulación con el agonista, los receptores

---

---

fosforilados vía GRKs e internalizados en vesículas contenían menos fosfatos que aquellos que se encontraban en la fracción de la membrana plasmática. Además, la fracción vesicular se encontraba enriquecida de una actividad de fosfatasa capaz de desfosforilar a los receptores.

La importancia de una actividad fosfatasa para el proceso de resensibilización y del subsecuente reciclaje de los receptores funcionales a la membrana plasmática, se demostró bloqueando el proceso de resensibilización del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, para lo cual se utilizó la caliculina A, un inhibidor de proteínas fosfatasas, y monensina, un inhibidor del tráfico intracelular (Pippig *et al.*, 1995). Recientemente se purificó de cerebro de bovino una proteína fosfatasa asociada a la membrana capaz de desfosforilar al receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (denominada GRP, fosfatasa de los receptores acoplados a proteínas G), la cual mostró ser una forma oligomérica de la proteína fosfatasa 2A (Pitcher *et al.*, 1995). Entonces se postuló el siguiente modelo [Fig. 5]: una vez internalizado, el receptor adquiere una conformación específica inducida por la acidificación intracelular en las vesículas dentro de las cuales se encuentran los receptores internalizados después de la estimulación con el agonista. La acidificación endosomal promueve una asociación entre el receptor y la proteína fosfatasa. Una vez desfosforilado, el receptor regresa a la

---

superficie celular donde puede nuevamente ser activado por el agonista (Krueger *et al.*, 1997).

Como podemos observar, las mismas moléculas que inician el proceso de desensibilización del receptor (esto es, GRKs y  $\beta$ -arrestinas) también inician el proceso de internalización a vesículas endosomales acidificadas, lo cual se requiere para la desfosforilación y la resensibilización del receptor.

## RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Mientras la rodopsina y el receptor  $\beta$ -adrenérgico sirvieron como sistemas modelo, se ha observado que la desensibilización es un fenómeno general que sufren muchos receptores acoplados a proteínas G, entre ellos, los receptores adrenérgicos, protagonistas principales de este trabajo.

Los receptores adrenérgicos son miembros de la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Estos receptores, denominados  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  (Langer, 1979; Berthelsen y Pettinger, 1977),  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  (Lands *et al.*, 1967), y  $\beta_3$ -adrenérgicos (Hieble y Bond, 1994), tienen una estructura general similar y se distinguen entre ellos por sus diferentes especificidades y efectos fisiológicos (Ahlquist, 1948; García-Sáinz, 1995). Las catecolaminas, adrenalina (epinefrina) y noradrenalina (norepinefrina) son los agonistas o activadores

---

naturales de los receptores adrenérgicos. Estos agentes son secretados en la porción interna de la médula de la glándula adrenal en respuesta a señales del sistema nervioso central. Estas catecolaminas pueden unirse a los diferentes tipos de receptores adrenérgicos y ejercer múltiples efectos en las células. Se sabe que las catecolaminas son mediadoras importantes de la contracción y relajación muscular, de la proliferación celular y de la memoria. En particular, la epinefrina incrementa la fuerza y frecuencia del corazón, la presión sanguínea y la dilatación de las vías respiratorias, que en conjunto incrementan el  $O_2$  liberado a los tejidos, especialmente al músculo. Algunos de los efectos metabólicos de la epinefrina son el incremento en la degradación y disminución en la síntesis del glucógeno y el aumento en la gluconeogénesis hepática lo que conlleva a un incremento en la liberación de glucosa del hígado; el incremento de la glucólisis y la utilización de ácidos grasos en el músculo, además del aumento en la secreción de glucagón y la disminución en la secreción de insulina (Lehninger *et al.*, 1992). La gran diversidad de efectos que ejercen los agentes adrenérgicos puede deberse en parte a que los distintos subtipos de estos receptores emplean, en general, dos sistemas de transducción: los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se acoplan al sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se acoplan de manera estimulante al sistema de la adenilato ciclasa, y los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos

---

se acoplan también a la adenilato ciclasa, pero inhibiendo su actividad (García-Sáinz, 1995).

### **EL RECEPTOR $\alpha_{1b}$ -ADRENÉRGICO**

En lo que respecta a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, a la fecha se han clonado 3 subtipos:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ , y  $\alpha_{1d}$ . Todos ellos transducen sus señales a través del sistema de fosfoinosítidos-calcio.

### **SISTEMA DE FOSFOINOSÍTIDOS-CALCIO**

Como mencioné anteriormente, la estimulación de los GPCRs por su agonista activa a la proteína Gq heterotrímica, provocando la disociación de las subunidades de esta proteína, seguido por el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G y ésta, dentro del sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio [Fig. 7], activa a la fosfolipasa C $\beta$  (FLC $\beta$ ). La fosfolipasa genera a partir del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (IP<sub>2</sub>) dos segundos mensajeros: el 1,2-diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>). Por su parte el DAG puede activar a diferentes miembros no convencionales de la proteína cinasa C ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ , y  $\theta$ ); por otro lado, el IP<sub>3</sub> difunde rápidamente en el

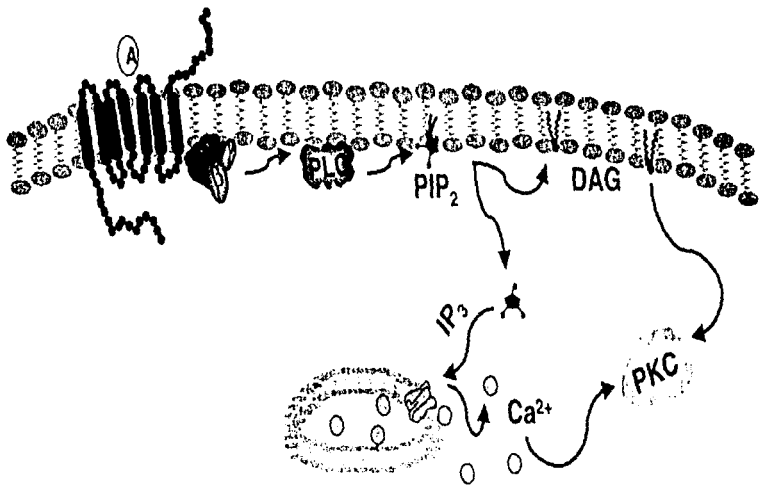


Fig. 7. Sistema de fosfoinosítidos-calcio.

A, agonista;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , proteína Gq heterotrimérica; PLC, fosfolipasa C; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; Ca<sup>2+</sup>, calcio; PKC, proteína cinasa C.

---

citoplasma y al unirse a sus receptores, que se localizan en el retículo endoplásmico, abre canales de calcio lo que permite la movilización del catión de reservorios intracelulares, llevando esto a la activación de isoformas convencionales de la PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ). Finalmente, la PKC fosforila y modifica la actividad de numerosas proteínas blanco que participan en las distintas respuestas celulares que se generan por la activación de los receptores.

### REGULACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha_{1b}$ -ADRENÉRGICO

Con los primeros estudios realizados acerca de los mecanismos bioquímicos que regulan la señalización de los receptores asociados con la FLC, se mostró que una variedad de este tipo de receptores es susceptible al fenómeno de desensibilización. Primeramente se demostró que los ésteres de forbol podían incrementar dramáticamente la fosforilación de varios receptores asociados a la FLC. La activación farmacológica de la PKC con ésteres de forbol reveló que se producía el bloqueo de las acciones del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico en células que expresan naturalmente este tipo de receptor (Corvera y García-Sáinz, 1984; Leeb-Lundberg *et al.*, 1985; Corvera *et al.*, 1986). Esto generó la siguiente pregunta: ¿la fosforilación mediada por PKC, puede tener un papel

---

importante en el fenómeno de desensibilización homóloga del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico?. Posteriormente se demostró que al depletar de PKC a la célula, mediante inhibidores o inducida por ésteres de forbol, no se alteraba el proceso de desensibilización homóloga de varios receptores, incluyendo los receptores para trombina (Paris y Pouyssegur, 1988), bombesina (Walsh *et al.*, 1993), histamina y ATP (Dickenson y Hill, 1993) y el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (Lattion *et al.*, 1994). Sin embargo, se sabía que una proteína cinasa estaba involucrada en dicho fenómeno. Se postuló entonces que estas cinasas podrían pertenecer a la familia de las GRKs. Más tarde, Diviani y colaboradores (Diviani *et al.*, 1996) demostraron, trabajando con células COS-7 y HEK293 transfectadas con el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, que al sobre-expresar a las GRK2 y GRK3 se incrementaba la fosforilación del receptor inducida por su agonista y se promovía la desensibilización del mismo.

En resumen, ahora se sabe que la actividad de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos se encuentra altamente regulada por procesos de fosforilación, donde principalmente participan GRKs (GRK2 y GRK3), en respuesta al agonista, y recientemente se demostró que la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico por la PKC está involucrada en procesos de desensibilización heteróloga de este receptor (Vázquez-Prado *et al.*, 1997).

A este respecto, en el presente estudio se muestra que la activación de los receptores para ácido lisofosfatídico induce la



---

---

fosforilación y subsecuente desensibilización del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, donde se sugiere la participación de una proteína cinasa distinta, la fosfatidilinositol 3-cinasa, además de la PKC. Por tanto, a continuación detallaré algunas características generales de los elementos que participan en este proceso.

### EL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO

El ácido lisofosfatídico (1-acil-glicerol 3-fosfato, al que me referiré en adelante como **LPA**) es uno de los fosfolípidos naturales más simples y también uno de los más interesantes. Originalmente se conocía como un intermediario clave en la síntesis *de novo* de lípidos; ahora se reconoce como un mediador intracelular que evoca diversas respuestas asociadas a las de los factores de crecimiento (Jalink *et al.*, 1994; Moolenaar, 1995a; Moolenaar, 1995b), activando a receptores específicos acoplados a proteínas G (Moolenaar, 1995a; Moolenaar, 1997) presentes en numerosos tipos de células.

En los primeros estudios realizados acerca del LPA, se encontró que inducía la contracción del músculo liso y la agregación plaquetaria; posteriormente se descubrió que el LPA es un mitógeno derivado de plaquetas, es decir, la fuente de LPA bioactivo son las plaquetas, las cuales lo liberan después de su activación (Eichholtz *et al.*, 1993). Como resultado, de la

---

activación plaquetaria, el LPA se encuentra como un ingrediente activo del suero (y no del plasma) en dosis fisiológicas relevantes, donde éste se une con alta afinidad a la albúmina. El LPA extracelular puede ser generado también a través de la fosfolipasa A2 (a partir de su precursor, el ácido fosfatídico) que actúa sobre microvesículas provenientes de las células sanguíneas cuando éstas son expuestas a estímulos inflamatorios (Fourcade *et al.*, 1995). Lo anterior sugiere que una de las funciones del LPA *in vivo* es estimular respuestas proliferativas en los sitios donde se presentan daño e inflamación.

Otras fuentes de LPA son los leucocitos, fibroblastos dañados, fagocitos y células endoteliales. Usualmente la señalización por LPA ocurre después de que hormonas, neurotransmisores, o factores de crecimiento inducen sus efectos celulares a través de la hidrólisis del  $IP_2$  para generar  $IP_3$  y DAG (Moolenaar *et al.*, 1992), resultando, entre otras, la generación del ácido fosfatídico [Fig. 8]. Se cree que la subsecuente generación del LPA es secundaria a la activación de una fosfolipasa específica para el ácido fosfatídico, la fosfolipasa A2, en el lado interno de la membrana plasmática.

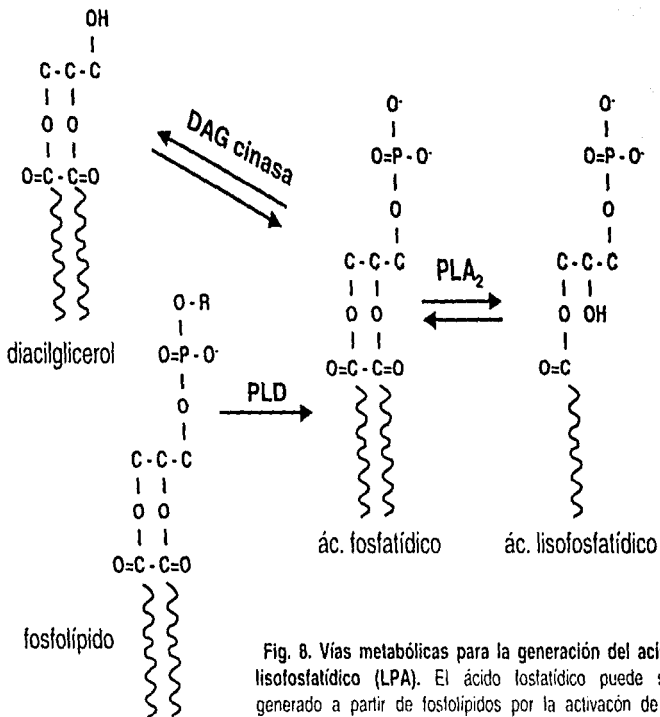


Fig. 8. Vías metabólicas para la generación del ácido lisofosfatídico (LPA). El ácido fosfatídico puede ser generado a partir de fosfolípidos por la activación de la fosfolipasa D (PLD) o por la fosforilación del diacilglicerol (DAG). Posteriormente, el ácido fosfatídico es convertido a LPA por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

## ACCIONES BIOLÓGICAS DEL LPA

La Tabla III lista algunas de las respuestas biológicas y celulares del LPA más importantes, las cuales son muy diversas y continúan acumulándose. Además de su papel como estimulante autocrino en la agregación plaquetaria, las últimas actividades sumadas a la lista incluyen la inhibición de la diferenciación en mioblastos (Yoshida *et al.*, 1996), la estimulación de la quimiotaxis en fibroblastos (Kundra *et al.*, 1995), la despolarización de la membrana en fibroblastos (Postma *et al.*, 1996), etc.

**Tabla III. Respuestas biológicas a LPA**

- Proliferación celular
- Inhibición de la diferenciación
- Diferenciación de keratinocitos
- Agregación de plaquetas
- Contracción del músculo liso
- Liberación de neurotransmisores
- Protección contra apoptosis
- Formación de fibras de estrés
- Invasión de células tumorales
- Quimiotaxis
- Despolarización de la membrana mediada por  $Cl^-$

---

Algunas de estas actividades se identificaron inicialmente como respuestas al suero, debido a que la mayoría de ellas son respuestas que se asocian a factores de crecimiento. Posteriormente, otros estudios mostraron que era el LPA quien generaba esta amplia gama de respuestas biológicas, y que todas ellas involucraban vías de señalización mediadas por proteínas G a través de receptores en la superficie celular (Moolenaar, 1995a; Moolenaar, 1997).

## RECEPTORES PARA ÁCIDO LISOFOSFÁTÍDICO

La primera identificación de un candidato para receptor del LPA se realizó mediante experimentos de marcaje por fotoafinidad, los cuales revelaron la presencia de una proteína de membrana (de 38-40 kDa), presente en varios tipos celulares, unida a [<sup>32</sup>P]LPA. Mediante estudios donde la unión fue inhibida en forma competitiva y específica por LPA no marcado, se demostró que esta proteína presentaba especificidad y alta afinidad por el LPA (van der Bend *et al.*, 1992).

Entre los descubrimientos más recientes, al respecto, sobresale la identificación de una familia de receptores de siete dominios transmembranales específicos para lisofosfolípidos, provisionalmente llamados receptores "Edg" (por sus siglas en inglés: "endothelial differentiation gene") o bien receptores LP

---

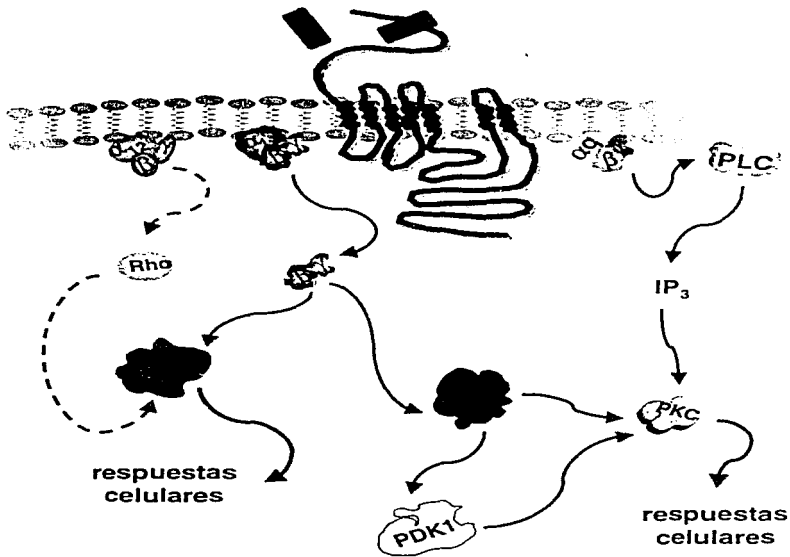
(por "lysophospholipid"). A la fecha, la familia de receptores Edg/LP consiste de por lo menos siete miembros que pueden subdividirse en dos subgrupos: los receptores que son específicos para LPA y los que unen con alta afinidad esfingosina-1-fosfato (S1P), un lisofosfolípido estructuralmente relacionado.

De los miembros de la familia de receptores Edg los Edg2, Edg4 y Edg7 son receptores para LPA, mientras que Edg1, Edg3 y Edg5 han sido caracterizados como específicos para S1P. Recientemente, Chun y colaboradores han propuesto una nomenclatura más apropiada para la familia de receptores para lisofosfolípidos "LP", en la cual el subgrupo LP<sub>A</sub> se refiere a los receptores para LPA y el subgrupo LP<sub>B</sub> a los receptores específicos para S1P (Chun *et al.*, 1999). Los estudios acerca de los mecanismos de señalización de esta familia de receptores indican que utilizan rutas acopladas a proteínas G, y que, de manera similar a otros GPCRs, los receptores Edg/LP sufren desensibilización rápida e internalización inducidas por su ligando (Lee *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999).

## VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL LPA

Los resultados de muchos estudios indican que los receptores para LPA se acoplan al menos a tres distintas proteínas G, incluyendo  $G_q$ ,  $G_{12/13}$  y  $G_i$ , activando así vías de señalización de gran diversidad y complejidad [Fig. 9].

En una gran variedad de células se ha observado que la estimulación de la fosfolipasa C inducida por LPA es insensible a toxina *pertussis* (PTX) (Moolenaar *et al.*, 1995a), lo cual sugiere que el receptor para LPA se acopla a miembros de la subfamilia  $G_q$ . Por otra parte, se ha observado que el LPA induce, mediante la activación de Rho, la reorganización del citoesqueleto y la formación de adhesiones focales, para lo cual el receptor para LPA se acopla a las proteínas  $G_{12/13}$  insensibles a PTX (Ridley y Hall, 1992; Barry y Critchley, 1994). Además de estas vías, en fibroblastos, el LPA disminuye rápidamente los niveles de AMP cíclico de manera sensible a PTX, lo cual sugiere el acoplamiento del receptor a proteínas G de la subfamilia  $G_i$  (Van Corven *et al.*, 1989). Por otra parte, el LPA también induce la activación de la cascada Ras/Raf/MAPK en una forma sensible a PTX (Howe y Marshall, 1993; Van Corven *et al.*, 1993), donde el dímero  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_i$  transduce dicho efecto, mediante la activación de proteínas cinasas de residuos de tirosina (Crespo *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 1994). Al



**Fig. 9. Vías de señalización del LPA a través de los diferentes tipos de proteínas G.**

LPA, ácido lisofosfatídico;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , proteínas G heterotrimericas; PLC, fosfolipasa C; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; PKC, proteína cinasa C; Rho, GTPasa rho; Tyr-K, cinasa de residuos de tirosina; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PDK1, proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos.



---

respecto se sabe que el LPA, al igual que muchos mitógenos activa, entre otras, a la fosfatidilinositol 3-cinasa y debido a que ésta es uno de los elementos importantes en este trabajo, describiré algunas de sus características principales.

### LA FOSFATIDILINOSITOL 3-CINASA (PI3K)

Muchos son los receptores capaces de estimular la actividad de la PI3K; entre los que se encuentran receptores para factores de crecimiento, receptores para citocinas y receptores acoplados a proteínas G. La PI3K cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) a PI 3-fosfato, del PI 4-fosfato (PI(4)P) a PI 3,4-bisfosfato, y del PI 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) a PI 3,4,5-trisfosfato. Estos fosfoinosítidos, productos de la PI3K actúan sobre múltiples efectores, los cuales interaccionan con dominios SH2 y dominios PH de las cinasas de residuos de serina/treonina y tirosina.

También se ha informado de la existencia de múltiples isoformas de la PI3K, las cuales se han dividido en tres clases (Wyman y Pirola, 1998; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Fruman *et al.*, 1998). Las subunidades catalíticas de todas las PI3Ks comparten una región homóloga que consiste de un núcleo catalítico asociado a un dominio llamado PIK (por su homología al dominio de cinasa de fosfoinosítidos), del cual se desconoce

---

su función. Los miembros de la clase I se han identificado hasta ahora como heterodímeros de aproximadamente 200 kDa, compuestos por una subunidad catalítica de 110-120 kDa y una subunidad adaptadora de 50-100 kDa. *In vitro*, estas PI3Ks pueden utilizar como sustratos PI, PI(4)P, y PI(4,5)P<sub>2</sub>; sin embargo, *in vivo* su sustrato preferido parece ser el PI(4,5)P<sub>2</sub>. La clase I de las PI3K está subdividida en las clases I<sub>A</sub> y I<sub>B</sub> (de las cuales hablaré con más detalle posteriormente), su activación está controlada por señales extracelulares vía receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina (clase I<sub>A</sub>) y vía receptores acoplados a proteínas G (clase I<sub>B</sub>). La clase II son moléculas grandes de 170-210 kDa cuyo elemento característico es un dominio C2 en el carboxilo terminal y presentan una especificidad por sustrato restringida a PI y PI(4)P. No se han identificado moléculas adaptadoras y su modo de activación permanece incierto. Finalmente, la clase III está representada por PI3Ks homólogas de una proteína de *S. cerevisiae* denominada Vps34p ("vacuolar protein sorting mutant", Herman y Emr, 1990) y fosforila exclusivamente PI. De esta clase sólo una subunidad catalítica ha sido identificada, la cual existe formando un complejo con una proteína cinasa de residuos de serina/treonina (denominadas Vps15p en levaduras y p150 en mamíferos).

## PI3Ks CLASE I

En lo que respecta a la clase I (la cual es de mayor interés para este trabajo), la activación de las PI3Ks por agonistas extracelulares involucra su translocación a la membrana plasmática mediante una vía por la cual logran tener acceso a sus sustratos. Dependiendo de la proteína adaptadora involucrada en este proceso, la clase I puede ser dividida en 2 grupos: las que son capaces de asociarse con p85 y pueden ser dirigidas a residuos de tirosinas fosforiladas (clase I<sub>A</sub>), y las que interaccionan con proteínas G heterotriméricas y con la proteína adaptadora p101 (clase I<sub>B</sub>).

En la clase I<sub>A</sub>, la subunidad p110 de estas PI3Ks existe formando un complejo con una proteína adaptadora que posee dos dominios SH2. En mamíferos se han encontrado tres isoformas de p110 (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , las cuales son codificadas por tres genes distintos) y por lo menos siete proteínas adaptadoras (generadas por expresión y splicing alternativo de tres diferentes genes: p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p55 $\gamma$ ). p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  están ampliamente distribuidas en tejidos de mamíferos, mientras que p110 $\delta$  muestra una distribución más restringida, encontrándose principalmente en leucocitos. Todos los tipos celulares de mamíferos que se han investigado expresan por lo menos una isoforma de la clase I<sub>A</sub>, las cuales son activadas al

---

estimular receptores que inducen actividad de cinasa de tirosinas.

Respecto a la clase I $\beta$ , la única PI3K identificada a la fecha es la subunidad catalítica p110 $\gamma$  que se encuentra formando un complejo con una proteína reguladora de 101 kDa (p101), la cual no presenta homología con alguna otra proteína conocida. La importancia de esta proteína radica en que los heterodímeros p110 $\gamma$ /p101 pueden ser activados directamente por las subunidades G $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas (Stephens *et al.*, 1994; Stoyanov *et al.*, 1995; Lopez-Illasaca *et al.*, 1997; Tang y Downes, 1997), y p101 es indispensable para las respuestas evocadas por G $\beta\gamma$  (Krugmann *et al.*, 1999). Se sabe que las subunidades G $\beta\gamma$  pueden activar a PI3K $\gamma$  mediante interacciones alostéricas o por translocación a la membrana. Por otra parte, se sabe también que todas las isoformas de la clase I tienen un dominio de unión a Ras (una proteína G de bajo peso molecular) (Rodríguez-Viciana *et al.*, 1996) y que únicamente p110 $\gamma$  exhibe una región homóloga a GAP (GAP del inglés: "GTPase-activating protein"), la cual puede doblarse para formar un dominio PH (Stoyanov *et al.*, 1995; Srinivasan *et al.*, 1996). Se ha especulado que esta región de p110 $\gamma$  está involucrada en la activación de PI3K $\gamma$  mediada por G $\beta\gamma$ , puesto que los dominios PH de proteínas que son reguladas por G $\beta\gamma$ , tales como la  $\beta$ ARK o la fosducina, han mostrado unir a dímeros G $\beta\gamma$  (Touhara *et al.*, 1994; Gaudet *et al.*, 1996). Posteriormente,

Leopoldt y colaboradores mostraron, mediante estudios de delección, que deben existir por lo menos dos sitios de unión para  $G\beta\gamma$  en la PI3K $\gamma$  (Leopoldt et al., 1998). Ellos proponen que uno de los sitios se encuentra en el amino-terminal próximo a un dominio PH y otro cercano al núcleo catalítico, por lo que  $G\beta\gamma$  puede estimular a la PI3K $\gamma$  por interacción directa con dos dominios de la subunidad catalítica p110.

### **INHIBIDORES DE LA PI3K**

La wortmanina y el LY294002 son dos compuestos de bajo peso molecular, estructuralmente no relacionados y permeables a la membrana celular, que a dosis bajas se comportan como inhibidores específicos de las PI3Ks; sin embargo, a dosis altas estos compuestos pierden especificidad (Ward et al., 1996). En contraste al LY294002, la wortmanina se une covalentemente a la subunidad catalítica de la PI3K, en una reacción que es competida por ATP y  $PI(4,5)P_2$  pero no por PI (Wymann et al., 1996); el LY294002 es un inhibidor competitivo del sitio de ATP (Vlahos et al., 1994).

Todos los miembros de las PI3Ks clase I, II y III muestran una sensibilidad similar a la wortmanina y al LY294002 *in vitro* (Domin et al., 1997). Actualmente, el tratamiento de las células con dosis de 5-20  $\mu$ M de LY294002 o de 20-50 nM de wortmanina, se utiliza

---

como herramienta para obtener evidencias de la participación de las PI3Ks en un sistema biológico determinado. Se ha observado que la wortmanina, a diferencia del LY294002, es inestable en soluciones acuosas y también que presenta una tendencia a interaccionar con proteínas del suero, lo cual hace difícil probar la dosis de la droga activa cuando se aplica a cultivos de tejidos por períodos más largos de dos horas.

## JUSTIFICACIÓN

---

---

Previos estudios han mostrado que la transmodulación entre receptores asociados a diferentes vías de señalización puede representar un mecanismo importante para la regulación de las respuestas evocadas por tales receptores, contribuyendo así a que las células, ya sea de forma individual o formando tejidos u órganos, puedan regular funciones vitales reaccionando de manera coordinada a varios estímulos a la vez, activando una o más vías para poder responder y adaptarse a todos los cambios del medio en el que se encuentran.

Como se ha venido mencionando, el proceso de desensibilización por efecto de hormonas y neurotransmisores es un mecanismo fundamental que regula la función de un receptor y que puede contribuir al mantenimiento de la actividad normal en las células. Han sido varios los estudios que muestran la existencia de un tipo de regulación indirecta entre receptores para diferentes hormonas, donde la activación de uno de ellos lleva a la desensibilización del otro. Al respecto, como antecedente directo del presente trabajo, en nuestro laboratorio se demostró que, en fibroblastos rat-1, la endotelina, a través de sus receptores  $ET_A$ , induce la fosforilación y desensibilización de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos,

---

involucrando a la proteína cinasa C y al parecer, a alguna proteína cinasa de residuos de tirosina.

En el presente estudio se muestra que la activación de los receptores para ácido lisofosfatídico induce la fosforilación y subsecuente desensibilización del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, con la participación de una proteína cinasa distinta, la fosfatidilinositol 3-cinasa, además de la PKC. Por tanto, determinamos la participación del receptor para el LPA en la regulación de la respuesta  $\alpha_{1B}$ -adrenérgica, teniendo como

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los efectos del LPA sobre el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico y los mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta  $\alpha_{1B}$ -adrenérgica, mediada por el ácido lisofosfatídico.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Explorar en fibroblastos rat-1 si la activación de los receptores para LPA, los cuales se expresan de manera endógena en este tipo de células, induce un incremento en el estado de fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.



- 
- Investigar la participación de las distintas proteínas G involucradas en la vía de transducción empleada por el LPA durante la regulación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.
  - Determinar la participación de las posibles proteínas cinasas en la fosforilación, mediada por el LPA, del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.
  - Estudiar el papel de la fosforilación en la regulación de la respuesta  $\alpha_{1B}$ -adrenérgica, determinando si se presenta un patrón de desensibilización por efecto de la activación de los receptores para LPA.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

---

Los materiales y métodos empleados durante la realización del presente trabajo se detallan en la sección de "Materials and Methods" del manuscrito titulado: "Lysophosphatidic acid modulates  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor phosphorylation and function. Roles of Gi and phosphatidylinositol 3-kinase", que se encuentra publicado en "Molecular Pharmacology" (dicho manuscrito se presenta más adelante en la sección de resultados).

A continuación se enumeran brevemente los pasos experimentales empleados en este trabajo.

### 1. CULTIVO DE FIBROBLASTOS Rat-1

Los fibroblastos de pulmón de rata de la línea celular rat-1 transfectados de manera estable con el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico de hámster, se obtuvieron por donación de los doctores: R. J. Lefkowitz, M. G. Caron y L. Allen de la Universidad de Duke. Los cultivos se mantuvieron bajo una atmósfera de  $CO_2$  a  $37^\circ C$  en medio DMEM con glucosa y glutamina suplementado con suero de bovino y antibióticos. Los experimentos se iniciaron con cultivos confluentes y privados de suero durante la noche anterior al experimento.

---

## 2. FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha_{1b}$ -ADRENÉRGICO

Para estudiar los efectos del LPA sobre el receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico, primeramente se procedió a explorar si la activación de los receptores para LPA inducía un incremento en el estado de fosforilación basal del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico.

- Para ello se midió, mediante la técnica de marcaje metabólico e inmunoprecipitación, el estado de fosforilación del receptor adrenérgico como resultado de la activación de los receptores para LPA durante un curso temporal, utilizando el LPA a una dosis de 1  $\mu$ M.
- Posteriormente se midió el mismo parámetro estimulando a las células con dosis crecientes de LPA durante 5 min.

Para estudiar los mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta  $\alpha_{1b}$ -adrenérgica, mediada por el ácido lisofosfatídico, se investigó la participación de proteínas G y proteínas cinasas involucradas en la vía de transducción empleada por el LPA durante la regulación del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico.

- 
- Para determinar el tipo de proteínas G, se incubaron las células en presencia de toxina *pertussis*, lo que nos permitió distinguir entre las proteínas G sensibles e insensibles a esta toxina.
  - El segundo paso fue determinar la participación de las diferentes proteínas cinasas en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico inducida por LPA, para lo cual se incubaron las células en presencia de inhibidores de cinasas, estudiando el efecto de tres distintas clases de inhibidores, dirigidos contra las siguientes clases de proteínas cinasas: cinasas de residuos de tirosina, PKC y PI3K.

### 3. DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha_{1b}$ -ADRENÉRGICO

Para determinar si la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico, estimulada por LPA, estaba asociada a la desensibilización de la respuesta adrenérgica, se determinó el estado funcional del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico.

- Como primer parámetro se midió la movilización de calcio intracelular provocada por norepinefrina después de estimular a las células con dosis crecientes de LPA.

- 
- 
- Posteriormente se determinó, en preparaciones de membranas, el efecto del LPA sobre el acoplamiento entre el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico y su proteína G. Lo anterior se realizó mediante estudios de unión de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S *in vitro*.
  - Finalmente se estudió el efecto de los inhibidores de cinasas en la desensibilización del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico mediada por el LPA, midiendo el acoplamiento entre el receptor adrenérgico y su proteína G, en preparaciones de membranas provenientes de células tratadas con los inhibidores de cinasas antes mencionados.

## RESULTADOS

---

Los resultados generados de este estudio se describen en el manuscrito titulado: "Lysophosphatidic acid modulates  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor phosphorylation and function. Roles of Gi and phosphatidylinositol 3-kinase", que se encuentra publicado en "Molecular Pharmacology".

A continuación se enumeran a manera de resumen los resultados del trabajo. Los números de figura que se indican corresponden a los números con los que se muestran dichas figuras en el manuscrito.

### 1. FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha_{1B}$ -ADRENÉRGICO INDUCIDA POR LPA

1.1 El receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico fue identificado como una sola banda proteínica con una masa molecular de ~85 kDa, la cual había sido inmunoprecipitada con un anticuerpo policlonal, generado en conejo y dirigido contra los últimos 10 aminoácidos del carboxilo terminal del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico de hámster. En un estudio previo, se demostró que el marcaje de esta proteína era específicamente bloqueado cuando se preincubaban las células con fentolamina o con prazosina (antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos), confirmando con ello que se trataba del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (Vázquez-Prado *et al.*, 1997).

---

**1.2** Como primer paso para dirigirnos hacia el estudio de la regulación de la respuesta  $\alpha_{1B}$ -adrenérgica, se probó la capacidad del LPA para inducir la fosforilación del receptor adrenérgico transfectado en fibroblastos rat-1. Se observó que el LPA fue capaz de incrementar considerablemente el estado de fosforilación basal del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico de manera rápida, la cual se mantuvo hasta por 60 minutos [Fig. 1]. Este efecto del LPA fue dependiente de su concentración con una  $EC_{50}$  de ~50 nM, provocando un incremento máximo en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico de 2.5 veces [Fig. 2].

Con el fin de estudiar los mecanismos de acción del LPA, se investigó la participación de proteínas G y proteínas cinasas.

**1.3** Se observó que el efecto del LPA sobre la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico se bloqueó cuando se preincubaron las células con toxina *pertussis* (PTX) [Fig. 3], lo que nos indicó la participación de proteínas G sensibles a esta toxina, probablemente del tipo  $G_i$ .

**1.4** La inhibición, con genisteína, de proteínas cinasas de residuos de tirosina no tuvo efecto alguno sobre la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico inducida por LPA. Sin embargo, este efecto se bloqueó casi completamente con

estaurosporina, un inhibidor relativamente selectivo de la PKC y con wortmanina, un inhibidor selectivo de la PI3K [Fig. 4]. La participación de la PKC y de la PI3K se demostró con el uso de otros inhibidores: para el caso de la PKC, bisindolilmaleimida ( $IC_{50}$  de  $\sim 80$  nM) y Ro 31-8220 ( $IC_{50}$  de  $\sim 185$  nM), que junto con estaurosporina ( $IC_{50}$  de  $\sim 125$  nM) bloquearon de manera dependiente de la concentración el efecto del LPA [Fig. 5]. De manera similar se observó con LY 294002 ( $IC_{50}$  de  $\sim 60$  nM) y con wortmanina ( $IC_{50}$  de  $\sim 4$  nM), para el caso de la PI3K [Fig. 6].

## 2. DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha_{1B}$ -ADRENÉRGICO INDUCIDA POR LPA

Para determinar si la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, estimulada por LPA, estaba asociada con la desensibilización de la respuesta adrenérgica, se determinó el estado funcional del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.

**2.1** Se sugirió que la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico promovida por el LPA tenía consecuencias funcionales, debido a que el LPA fue capaz de bloquear considerablemente la capacidad del agonista adrenérgico (la norepinefrina) para inducir la movilización de calcio intracelular después de estimular a las células con dosis crecientes de LPA [Fig. 7].



---

**2.2** Posteriormente, se demostró que el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico estaba sujeto a desensibilización inducida por LPA, estudiando el acoplamiento entre el receptor adrenérgico y su proteína G. Lo anterior se realizó mediante estudios de unión de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S *in vitro*, en membranas provenientes de células pretratadas con LPA, donde se observó que prácticamente fue bloqueada la unión de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S, estimulada por norepinefrina [Fig. 8], lo cual mostró que el receptor adrenérgico era incapaz de acoplarse a su proteína G.

**2.3** El efecto anterior del LPA sobre la unión de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S estimulada por norepinefrina se restituyó al preincubar primero las células con los inhibidores de cinasas estaurosporina y wortmanina [Fig. 8], lo que nos demuestra que en la desensibilización del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico inducida por LPA están involucradas la PKC y la PI3K.

**2.4** De igual forma, al preincubar las células con PTX se reduce marcadamente el efecto del LPA sobre el acoplamiento entre el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico y su proteína G, indicándonos la participación de una proteína  $G_i$  en este proceso de desensibilización del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico [Fig. 9, mostrada fuera del manuscrito].

## Lysophosphatidic Acid Modulates $\alpha_{1B}$ -Adrenoceptor Phosphorylation and Function: Roles of Gi and Phosphoinositide 3-Kinase

PATRICIA CASAS-GONZÁLEZ, JOSÉ VAZQUEZ-PRADO, and J. ADOLFO GARCÍA-SAINZ

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

Received August 30, 1999; accepted January 20, 2000

This paper is available online at <http://www.molpharm.org>

### ABSTRACT

The effect of lysophosphatidic acid on the phosphorylation and function of  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors transfected into rat 1 fibroblasts was studied. This phospholipid mitogen increased in a concentration-dependent fashion ( $EC_{50} = 50$  nM) the phosphorylation of these adrenoceptors. Lysophosphatidic acid-induced  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor phosphorylation was relatively rapid ( $t_{1/2} = 1$  min), intense (2.5-fold), and sustained for at least 60 min. The effect of lysophosphatidic acid was blocked by pretreatment with pertussis toxin. The  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor phosphorylation induced by lysophosphatidic acid was not blocked by genistein, a tyrosine kinase inhibitor, but it was inhibited by inhibitors of protein kinase G (bisindolylmaleimide I, staurosporine, and Ro 31-8220) and phosphoinositide 3-kinase (wortmannin and LY 294002). The ability of norepinephrine to increase cytosolic calcium concentration was markedly decreased in cells previously

challenged with lysophosphatidic acid. Norepinephrine-induced [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding in membrane preparations was used as an index of the functional coupling of the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors and G proteins. Norepinephrine-stimulated [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding was markedly decreased in membranes from cells pretreated with lysophosphatidic acid. This effect of lysophosphatidic acid was blocked by pretreatment with wortmannin or staurosporine. Our data indicate that: 1) activation of lysophosphatidic acid receptors induce phosphorylation of  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors; 2) this effect is mediated through pertussis toxin-sensitive G proteins, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C; and 3) the phosphorylation of  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors induced by the lipid mitogen is associated to adrenoceptor desensitization.

G protein-coupled receptors play a central role in cellular communication mediating the response to numerous hormones and neurotransmitters. There are intense interactions among the different receptor signaling pathways ("cross talk"), and such interactions play cardinal roles in determining cell responsiveness.

Control of receptor function is a key event in the adaptation of cells to changes in the internal milieu of an organism and to the overall homeostasis. Different cellular processes with different time frames seem to be involved. This includes modulation of receptor coupling to G proteins, receptor internalization, recycling to the plasma membrane, and degradation and regulation of expression (Lefkowitz et al., 1998). An initial event in the control of receptor function seems to be the phosphorylation of the receptors themselves. Three groups of protein kinases are the major modulators of G protein-coupled receptors: 1) second messenger-activated ki-

nases, such as protein kinase A and protein kinase C (PKC) (Clark et al., 1988; Houslay, 1991); 2) members of the G-protein receptor kinase (GRK) family (Ferguson et al., 1997; Krupnick and Benovic, 1998), and 3) some receptors with tyrosine kinase activity (Haleck et al., 1992).

It is generally accepted that homologous desensitization, in which only the receptors that are activated reduce their responsiveness, involves receptor phosphorylation by GRKs (Ferguson et al., 1997; Krupnick and Benovic, 1998). Accordingly, agonist-occupied receptors activate heterotrimeric G proteins, release G $\beta\gamma$  complexes, and recruit soluble GRKs (particularly GRK2) (Pitler et al., 1998). These enzymes phosphorylate the receptors, which bind  $\beta$ -arrestin molecules, stabilizing the uncoupled state of the receptor (Krupnick and Benovic, 1998).  $\beta$ -Arrestin acts as a bridge binding to clathrin molecules. This initiates the internalization of phosphorylated receptors into vesicles where specific phosphatases remove the phosphates and allow the dephosphorylated receptors to return to the cell surface, completing the cycle of activation-desensitization-resensitization (Fergu-

This research was partially supported by grants from Dirección General de Asesoría del Personal Académico (DGAPA) and DGICyT and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (27566N).

**ABBREVIATIONS:** PKC, protein kinase C; AR, adrenoceptor; LPA, lysophosphatidic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GRK, G-protein-coupled receptor kinase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; [ $Ca^{2+}$ ] $_i$ , cytosolic calcium concentration; NE, norepinephrine; TPA, tetradecanoyl phorbol acetate; PDK1, phosphoinositide-dependent protein kinase-1.

son et al., 1997; Krupnick and Benovic, 1998). Second messengers-activated kinases, such as protein kinase A and PKC, and receptors with endogenous tyrosine kinase activity also promote receptor phosphorylation, eliciting heterologous desensitization by a parallel process that does not require receptor activation (Clark et al., 1988; Hadcock et al., 1992; Pfitzer et al., 1998).

The activity of  $\alpha_2$  adrenoceptors ( $\alpha_2$ ARs) is tightly regulated. Most studies indicate that, when activated by agonists GRKs phosphorylate  $\alpha_2$ ARs (Lattion et al., 1994; Diviani et al., 1996). GRK-2 and GRK-3 seem to be the isoforms that mainly participate in this effect (Diviani et al., 1996). Pharmacological activation of PKC with phorbol ester blocks  $\alpha_2$  adrenergic actions in cells that naturally express this receptor (Corvera and Garcia-Sainz, 1984; Leeb Lundberg et al., 1985; Corvera et al., 1986). Likewise, this effect has been observed in cells transfected with this receptor, and this is associated to receptor phosphorylation (Lattion et al., 1994; Diviani et al., 1997; Vazquez-Prado et al., 1997; Medina et al., 1998). On a more physiological context, it has been recently observed that activation of end-thelin (ET<sub>A</sub>) receptors induce phosphorylation of  $\alpha_2$ ARs and uncoupling of these receptors from G proteins (Vazquez-Prado et al., 1997). The effect of endothelin is mediated by pertussis toxin-insensitive G proteins and involves activation of PKC and an as yet unidentified tyrosine kinase, no role of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) was observed in this effect of endothelin (Vazquez-Prado et al., 1997).

Lysophosphatidic acid (LPA) is a water soluble phospholipid that is released by cells such as platelets during activation. It is a mitogen for many cells and evokes other actions such as contraction, secretion, adhesion, or chemotaxis (Moolenaar et al., 1997; Coetzee and Xu, 1998). The actions of LPA are mediated through G protein-coupled receptors (Fukushima et al., 1998; Chou et al., 1999). These receptors seem to couple to Gq and Gi/van Corven et al., 1989). LPA inhibits adenyl cyclase (van Corven et al., 1989), and increases cytosolic calcium concentration (Carr et al., 1994; Hordyk et al., 1994). In 1998, generation of inositol phosphates (Hordyk et al., 1994), phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (Hordyk et al., 1994), and protooncogene expression (van Corven et al., 1993; Chuprun et al., 1997). Interestingly, many of the actions of LPA seem to involve heterotrimeric G proteins (van Corven et al., 1989, 1993; Carr et al., 1994; Hordyk et al., 1994; Chuprun et al., 1997). The effect of LPA was studied in rat-3 fibroblasts stably expressing  $\alpha_2$ ARs; it was observed that LPA induces  $\alpha_2$ AR phosphorylation and G protein uncoupling. Such action of LPA involves pertussis toxin-sensitive G proteins and PI3K and represents a new process for the modulation of this AR.

### Experimental Procedures

**Materials.** [<sup>3</sup>H]-Norepinephrine (NE), LPA (endothelin endothelin-1, tetradecanoyl-phosphatidylcholine (TPA), GTP $\gamma$ S, staurosporine, wortmannin, and protein inhibitors were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Pertussis toxin was purified from vaccine concentrates as described previously (Sekura et al., 1993). Garcia-Sainz et al., 1995. Pertussis toxin dissolved in medium (DMEM), fetal bovine serum, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from Life Technologies (Gaithersburg, MD). [<sup>3</sup>H]SSGTPS (1250 Ci/mmol) and [<sup>3</sup>H](-)-isoproterenol (1250 Ci/mmol)

were from New England Nuclear (Boston, MA). Butiridylmethylamide (1,1',1'-CY 204-02), and Ro-31-8220 were obtained from Calbiochem (San Diego, CA). Sephadex coupled protein A was from Pharmacia Biotechnology (Lake Bluff, NY). Fura-2/AM was from Molecular Probes (Eugene, OR), and gentamicin was from Biowatch Biomedical International (Stuyck, MA).

**Cell Lines and Cultures.** Rat 3 fibroblasts transfected with the hamster  $\alpha_2$ AR (Cotman et al., 1986), generously provided to us by Dr. R. J. Lefkowitz, M. G. Corral, and J. Allen (Duke University, Durham, NC), were cultured in glutamine containing high glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were treated with neomycin analog (2–40  $\mu$ M), 100  $\mu$ M streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25  $\mu$ M amphotericin B at 37°C under a 50% air/50% CO<sub>2</sub> atmosphere as described previously (Vazquez-Prado et al., 1997). For all the experiments, confluent cells were serum deprived overnight in unamplified DMEM.

**$\alpha_2$ AR Phosphorylation.** Rat 3 cells expressing the  $\alpha_2$ ARs were incubated in phosphate-free DMEM for 1 h and then labeled in the same medium containing [<sup>32</sup>P]-5'  $\alpha$ -dATP for 1 h at 37°C as described previously (Vazquez-Prado et al., 1997). In brief, after treatment with inhibitors and/or agonists, cells were washed with ice-cold PBS and lysed for 15 min in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.05% SDS, 50 mM NaF, 100 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM piperophosphate, 10 mM sodium propylphosphate, 1 mM phosphatase, 1 mM phospho-lysine, and protein inhibitors (200  $\mu$ M leupeptin, 20  $\mu$ M aprotinin, 100  $\mu$ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 500  $\mu$ M bacitracin, and 50  $\mu$ M n-ethylmaleimide tyrosin inhibitor). Cell lysates were centrifuged at 4°C with the addition of AR antiserum (Vazquez-Prado et al., 1997) and protein A-Sepharose. After five washes with 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.05% SDS, 150 mM NaF, 60 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, the sample was denatured by boiling in SDS sample buffer containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol and subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were dried and exposed for 10–24 h at 25°C using Kodak X-Omat X-ray films and intensifying screens. The level of receptor phosphorylation was assessed in the same gels with a Molecular Dynamics (Gaithersburg, MD) PhosphorImager and Imagequant software.

**[<sup>3</sup>H]GTP $\gamma$ S Measurements.** Confluent fibroblasts were incubated overnight in DMEM without serum and antibiotics. Cells were loaded with 5  $\mu$ M Fura-2/AM in Krebs Henseleit (KHES) containing 0.05% BSA, pH 7.4 for 1 h at 37°C. Cells were detached by gentle trypsinization, and fluorescence measurements were carried out as described previously (Vazquez-Prado et al., 1997) with an Aminco-Bowman (Columbus, OH) Series 2 Spectrometer with the excitation monochromator set at 340 and 380 nm, a chopper internal set at 5 Hz, and the emission monochromator set at 510 nm. [<sup>3</sup>H]GTP $\gamma$ S was added to the cells as described previously (Vazquez-Prado et al., 1997) using the method provided by AMINCO-Bowman, traces were directly exported to the 8640s.

**Membrane Preparation and [<sup>3</sup>H]SSGTPS Binding.** Confluent cells were stimulated in the absence (control) or presence of the different agonists for 5 min at 37°C. The reaction was terminated by washing with ice-cold PBS, and cells were scraped with 1 ml of ice-cold buffer containing 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM piperophosphate, 10 mM sodium propylphosphate, plus protease inhibitors as in the lysis buffer. Membranes were prepared and [<sup>3</sup>H]SSGTPS binding was performed as described by Wieland and Jakobs (1994) with minor modifications (Vazquez-Prado et al., 1997). Briefly, membranes were resuspended in binding buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM EGTA, 10 mM BSA). Binding was performed at 25°C for 30 min in a volume of 250  $\mu$ l of binding buffer containing 0.2 nM [<sup>3</sup>H]SSGTPS. The reaction was initiated by the addition of membranes (25  $\mu$ g of protein/ml) and terminated by

rapid filtration through Whatman GFC filters followed by three washes of the filters with ice-cold buffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). The filters were dried, and the radioactivity was measured by liquid scintillation. Nonspecific binding was determined in the presence of unlabeled GTP $\gamma$ S (30  $\mu$ M) and represented 10% of total binding. Statistical analysis between comparable groups was performed using ANOVA with Bonferroni's post test.

### Results

As shown in Fig. 1, LPA (1  $\mu$ M) induced a relatively rapid increase in  $\alpha_1$ -AR phosphorylation ( $t_{1/2}$  ~ 1 min, maximum ~ 15 min). Such increased phosphorylation was sustained up to 60 min (Fig. 1). The effect of LPA was concentration-dependent with an EC<sub>50</sub> of ~ 50 nM and a maximum increase in phosphorylation of 2.5-fold (Fig. 2).

To get additional insight on the mechanism of this action of LPA, the effect of pertussis toxin was tested. Cells were pretincubated with pertussis toxin (300 ng/ml for 3 h or 100 ng/ml for 24 h, which resulted in identical data) under conditions that essentially inactivated all pertussis toxin-sensitive G proteins (Vázquez-Prado et al., 1997), and the effects of NE, LPA, and TPA on  $\alpha_1$ -AR phosphorylation were tested. It can be seen in Fig. 3 that the actions of NE and TPA were not affected at all by the pretreatment with pertussis toxin, which is in agreement with previous data (Vázquez-Prado et al., 1997). In contrast, the  $\alpha_1$ -AR phosphorylation induced by LPA was almost completely inhibited.

Further differences became evident through the use of kinase inhibitors. Staurosporine (300 nM), a relatively selective inhibitor of PKC, genistein (10  $\mu$ M), a protein tyrosine kinase inhibitor, and wortmannin (100 nM), a selective PI3K inhibitor, were tested. None of these agents at the concentrations tested altered basal receptor phosphorylation (data not shown). Similarly and in agreement with previous data (Vázquez-Prado et al., 1997), none of these agents altered in any way the  $\alpha_1$ -AR phosphorylation induced by NE (Fig. 4). In contrast, the effect of LPA was not altered by genistein, but it was almost completely abolished by either staurosporine or wortmannin (Fig. 4). Wortmannin is unable to alter the

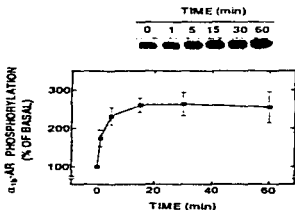


Fig. 1. Time course of the effect of 1  $\mu$ M LPA on  $\alpha_1$ -AR phosphorylation. Cells were incubated in the absence or presence of LPA. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 15 determinations using five different cell cultures. A representative autoradiogram is shown.

$\alpha_1$ -AR phosphorylation induced by endothelin (Vázquez-Prado et al., 1997) or TPA (data not shown). To further substantiate these findings, the effect of several inhibitors of these kinases was studied. The PKC inhibitors bisindolylmaleimide-1 (IC<sub>50</sub> ~ 80 nM), staurosporine (IC<sub>50</sub> ~ 125 nM), and Ro 31-8220 (IC<sub>50</sub> ~ 165 nM) blocked in concentration-dependent fashion the effect of LPA on  $\alpha_1$ -AR phosphorylation (Fig. 5). Similarly, wortmannin (IC<sub>50</sub> ~ 4 nM) and LY 294002

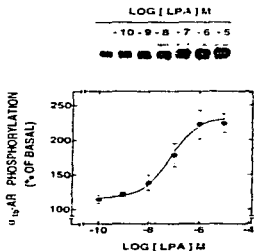


Fig. 2. Concentration-response curve for the effect of LPA on  $\alpha_1$ -AR phosphorylation. Cells were incubated with the indicated concentrations of LPA. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 15 determinations using five different cell cultures. A representative autoradiogram is shown.

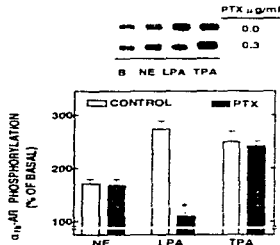


Fig. 3. Effect of pertussis toxin on  $\alpha_1$ -AR phosphorylation. Cells were pretincubated in the absence (open bars) or presence of 0.3  $\mu$ M pertussis toxin (PTX, solid bars). Cells were incubated for 5 min in the absence of agent (B) or in the presence of 10  $\mu$ M NE, 1  $\mu$ M LPA, or 1  $\mu$ M TPA. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 15 determinations using five different cell cultures. Representative autoradiograms are shown. \* $P$  < 0.01 versus LPA CONTROL.

( $IC_{50} \sim 60$  nM), which are inhibitors of PI3K, blocked the effect of LPA on  $\alpha_{12}$ -AR phosphorylation (Fig. 6).

To determine if  $\alpha_{12}$ -AR phosphorylation induced by LPA has any functional consequence, two parameters were studied: the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by NE in whole cells and the  $\alpha_{12}$ -AR-mediated stimulation of  $[^{35}S]GTP\gamma S$  binding to membranes. It can be seen in Fig. 7 that NE and LPA were able to induce marked increases in  $[Ca^{2+}]_i$ . However, when NE was added to the cells after stimulation by LPA the adrenergic effect was markedly inhibited. These data are consistent with desensitization of the adrenergic action. However, this effect was not selective because after the initial action of LPA, the effect of a second stimulation by the same agent or by endothelin resulted in decreased responses (Fig. 7). These data suggest that depletion of calcium stores is taking place and that the action of LPA on  $\alpha_{12}$ -adrenergic-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  cannot be explained only on the basis of receptor desensitization. Therefore, a more direct experimental approach, such as the adrenergic-mediated  $[^{35}S]GTP\gamma S$  binding, which is an index of  $\alpha_{12}$ -AR-G protein interaction, was studied.

In these studies, cells were incubated in the absence of any agent (control) or in the presence of either 10  $\mu M$  NE or 1  $\mu M$  LPA for 5 min. Membranes were obtained, and the effects of NE or LPA on  $[^{35}S]GTP\gamma S$  binding *in vitro* were studied. It can be observed that in membranes from control cells NE and LPA stimulated  $[^{35}S]GTP\gamma S$  binding (Fig. 8). In cells incubated with NE, the effect of the adrenergic agonist but not that of LPA on  $[^{35}S]GTP\gamma S$  binding was inhibited (Fig. 8). In cells treated with LPA, the *in vitro* effect of NE was essentially abolished, but the effect of LPA was not altered (Fig. 8). In cells incubated with pertussis toxin, the effect of LPA on  $[^{35}S]GTP\gamma S$  binding was markedly inhibited but that of NE was not affected (data not shown). In addition, it was observed that preincubation with wortmannin or staurosporine

blocked the effect of LPA on NE-stimulated  $[^{35}S]GTP\gamma S$  binding (Fig. 8). These data clearly indicate that the  $\alpha_{12}$ -AR phosphorylation induced by LPA is associated to G protein uncoupling (desensitization).

## Discussion

These results indicate that LPA induces  $\alpha_{12}$ -AR phosphorylation and receptor-G protein uncoupling. The increase in receptor phosphorylation induced by this lipolipid is similar in magnitude to that observed with endothelin and larger than that induced by NE (Vázquez-Prado et al., 1997). The time course of the effect of LPA markedly differs with those previously observed with NE and endothelin (Vázquez-Prado et al., 1997). The actions of these latter agents were faster, reaching their maximum at 5 min and rapidly declining to nearly basal levels at 60 min (Vázquez-Prado et al., 1997).

The ability of pertussis toxin to block this action of LPA is consistent with the involvement of G proteins of the  $G_i$  subfamily in mediating many of the actions of this lipolipid (van Gerven et al., 1989, 1993; Carr et al., 1994; Hordyk et al., 1994; Chuprun et al., 1997). The data are particularly interesting because they show the modulation of a G $\beta\gamma$ -coupled receptor, such as the  $\alpha_{12}$ -AR (Wu et al., 1992, 1995), by a receptor coupled to pertussis toxin sensitive G proteins, which are likely to be the  $G_i$  subfamily. The pertussis toxin sensitivity clearly indicates that the effect of LPA differs

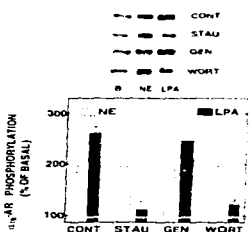


Fig. 4. Effect of staurosporine, pertussis toxin, and wortmannin on LPA- and NE-induced  $\alpha_{12}$ -AR phosphorylation. Cells were preincubated for 10 min in the absence of any agent (CONT) or presence of 300 nM staurosporine (STAU), 10  $\mu M$  genistein (GEN), or 100 nM wortmannin (WORT). Cells were then incubated with 10  $\mu M$  NE (open bars) or 1  $\mu M$  LPA (solid bars) for 5 min. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 15 determinations using five different cell cultures. Representative autoradiographs are shown in Fig. 1 (CONT) versus LPA/CONT.

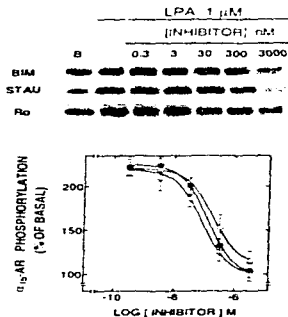


Fig. 5. Effect of PKC inhibitors on LPA-induced  $\alpha_{12}$ -AR phosphorylation. Cells were preincubated for 30 min in the presence of different concentrations of bisindolylmaleimide 1 (BIAA), staurosporine (STAU), and calyculin A (Ro 31-8220) (Ro, open circles), staurosporine (STAU), and calyculin A (Ro 31-8220) (Ro, open triangles). After this preincubation, 1  $\mu M$  LPA was added and the incubation continued for 5 min. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of four to seven determinations using different cell cultures. Representative autoradiographs are shown in Fig. 1, basal.

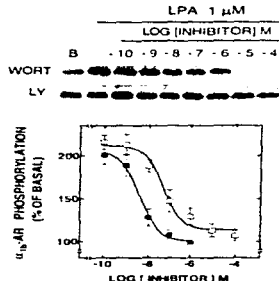


Fig. 6. Effect of PDK inhibitors on LPA-induced  $\alpha_1$ -AR phosphorylation. Cells were preincubated for 30 min in the presence of different concentrations of wortmannin (WORT, solid squares) or LY 294002 (LY, open squares). After this preincubation, 1  $\mu$ M LPA was added, and the incubation continued for 5 min. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of four to seven determinations using different cell cultures. Representative autoradiographs are shown.

from both that due to receptor activation, putatively mediated through GRKs [Lotton et al., 1994; Diviani et al., 1996], and that induced by direct pharmacological activation of PKC. Previously, it was shown that the  $\alpha_{1B}$ -AR phosphorylation induced by endothelin is mediated through pertussis toxin-insensitive G proteins [Vazquez-Prado et al., 1997]. This is the first example of a Gi-coupled receptor modulating the phosphorylation state and function of  $\alpha_1$ -ARs.

It should be mentioned that  $\alpha_{1B}$ -AR phosphorylation induced by endothelin was partially blocked by genistein or staurosporine and completely blocked when both protein kinase inhibitors were present, which suggested participation of PKC and protein tyrosine kinases in this effect [Vazquez-Prado et al., 1997]. These data suggest that  $\alpha_{1B}$ -AR phosphorylation induced by LPA did not involve protein tyrosine kinases but PKC and, interestingly, PI3K. This further emphasizes the differences in the cross talk between  $\alpha_1$ -ARs and endothelin receptors (Gq/11-coupled) and LPA receptors (Gi-coupled).

The role of PKC in modulating  $\alpha_1$ -AR function has been extensively documented. In fact, in a very elegant work, the PKC phosphorylation sites of the hamster  $\alpha_1$ -AR were recently identified as Ser<sup>188</sup> and Ser<sup>401</sup> located at the carboxyl terminus [Diviani et al., 1997]. The role of PI3K is particularly interesting. PI3K is a family of enzymes, which has been grouped into several classes. In class IA, PI3K isoforms, the adaptor p85 subunit interacts with phosphorylated tyrosine motifs of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, whereas PI3K $\gamma$  (class IB isoform) interacts with heterotrimeric G proteins via the p101 protein; such interactions

seem to control PI3K activity [Nielsen and Durieux, 1998; Wymann and Pirrola, 1998].

The mechanism through which PI3K stimulates PKC activity likely involves a direct interaction with the phosphonotides generated by PI3K. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate have been reported to activate novel PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ , and  $\eta$  and atypical PKC  $\zeta$  and  $\lambda$  isoforms [Nakanishi et al., 1993; Nielsen and Durieux, 1998; Wymann and Pirrola, 1998; Ramels and Cantley, 1999]. An intermediate kinase such as the recently identified phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) [Alessi and Cohen, 1998; Stephens et al., 1998] may also participate in the control of PKC. PDK1, which binds with high affinity to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, phosphorylates the activation loop sites of PKC $\zeta$  and PKC $\lambda$  in vitro and in a PI3K-dependent manner in vivo [Chow et al., 1998; Le Good et al., 1998]. Interestingly, classical PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I, and  $\beta$ II bind directly to PDK1 coexpressed in HEK 293 cells [Le Good et al., 1998], raising the possibility of general control of the PKC family by PDK1.

The nearly complete inhibition of receptor phosphorylation observed in the presence of PI3K inhibitors (wortmannin and LY 294002) or PKC inhibitors (bisindolylmaleimide I, staurosporine, and Ro 31-8220) suggests that these enzymes may act sequentially in the same linear signaling pathway. In accord with current ideas, our data suggest that: 1) LPA activates its receptors that interact and activate pertussis toxin-sensitive G proteins, which are likely of the Gi family; 2) this allows the activation of PI3K, which leads to activation of PKC via interaction with either 3-phosphoinositides or phosphorylation by PDK1; and 4) PKC catalyzes the phosphorylation of  $\alpha_1$ -ARs.

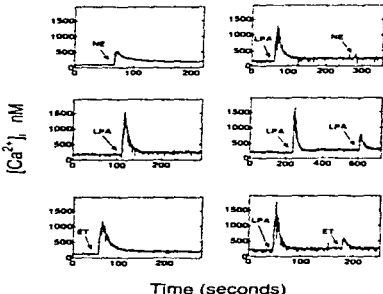
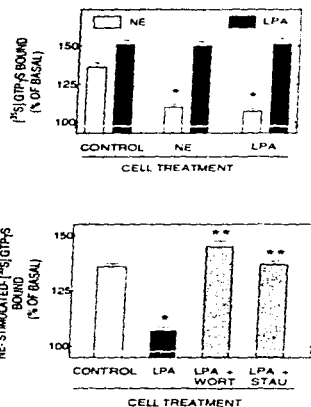


Fig. 7. Effects of LPA on the NE-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase. Cells were loaded with Fura-2/AM, and  $[Ca^{2+}]_i$  was recorded. Where indicated, 10  $\mu$ M NE, 1  $\mu$ M LPA, or 10 nM endothelin-1 (ET) was added. Traces are representative of three to four experiments using different cultures.



**Fig. 8.** In vitro agonist-stimulated  $^{125}\text{I}(\text{GTP})\text{S}$  binding to membranes. Top: cells were incubated for 5 min in the absence of any agent (CONTROL) or presence of 10  $\mu\text{M}$  NE or 1  $\mu\text{M}$  LPA, and membranes were obtained. In vitro  $^{125}\text{I}(\text{GTP})\text{S}$  binding to membranes was performed in the absence of any stimulus (basal) or presence of either 10  $\mu\text{M}$  NE (open bars) or 1  $\mu\text{M}$  LPA (solid bars). Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 20 to 25 determinations using membranes obtained from three different cell cultures.  $^{*}P < 0.01$  versus NE CONTROL. Bottom: cells were incubated for 30 min. Where indicated, 100 nM wortmannin (WORT) or 1  $\mu\text{M}$  staurosporine (STAU) was present during the last 5 min, no agent (CONTROL) or 1  $\mu\text{M}$  LPA was added. In vitro  $^{125}\text{I}(\text{GTP})\text{S}$  binding to membranes was performed in the absence any stimulus (basal) or presence of 10  $\mu\text{M}$  NE. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 10 to 12 determinations using membranes obtained from two different cell cultures.  $^{*}P < 0.01$  versus CONTROL.  $^{**}P < 0.01$  versus LPA.

In summary, our data indicate that LPA induces  $\alpha_{12}\text{AR}$  phosphorylation through a PI3K- and PKC-dependent pathway. Such phosphorylation is associated to receptor-G protein uncoupling. The data indicate that the function of  $\alpha_{12}\text{AR}$  is regulated by diverse processes including homologous modulation, i.e., due to activation by agonist and putatively GRKs, and heterologous modulations by receptors coupled to  $\text{G}_{\beta 1}$ , such as the endothelin  $\text{ET}_A$  receptors, and by receptors coupled to  $\text{G}_i$ , such as LPA receptors. A key role of PKC is evident in heterologous modulations.

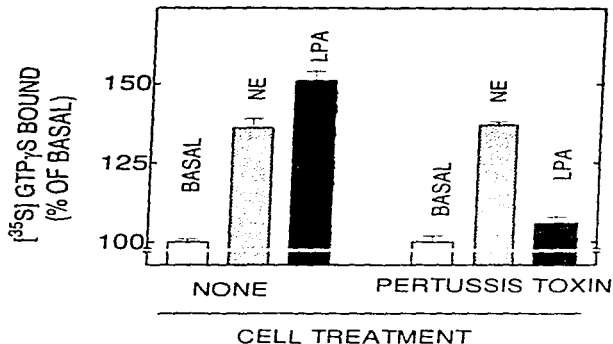
#### References

- Almeida-Ferreira and Cohen P. (1996): Mechanisms of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Cell Biol* 8:573-872.
- As, S., Chan, F., Zhang, W., and Cohen P. (1998): Recruitment of human G protein-coupled receptors to the membrane by phosphoinositide 3-kinase-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273:12112-12118.
- Chen J., Gorman M., and Mullan J. (1996): Stimulation of high affinity  $\text{G}_{\beta 1}$  protein-coupled receptors by phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 271:11128-11133.
- Chen J.M., Han, M., and Cohen P. (1998): The phosphoinositide 3-kinase-dependent protein kinase is required for heterologous activation of adrenergic receptors in rat and mouse. *J Biol Chem* 273:12119-12124.
- Chen J., Cohen P., and Mullan J. (1999): A protein family of receptors for phosphoinositide and LPA and other lipophospholipids. *Eur J Pharmacol* 365:213-242.
- Cohen P., Raymond J.R., and Planchet R. J. (1997): The heterotrimeric G protein  $\beta\gamma$  mediates phospholipid- and activated  $\text{G}_{\beta 1}$ -induced activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 272:73-79.
- Cooper D.J., Kowalewski T., and Cohen P. (1998): Activation of phosphoinositide-dependent protein kinase is required for heterologous activation of adrenergic receptors in rat and mouse. *J Biol Chem* 273:12125-12129.
- Corvera S. and Garcia-Naya J.A. (1991): Phorbol esters inhibit  $\alpha_{12}$  adrenergic regulation of protein kinase C. *J Neurochem* 56:1112-1118.
- Corvera S., Alvarez R.K., Graham R.M., and Garcia-Naya J.A. (1994): Phorbol esters inhibit  $\alpha_{12}$  adrenergic effects and decrease the affinity of  $\alpha_{12}$  adrenergic receptors for epinephrine. *J Biol Chem* 269:120-126.
- Corvera S., Alvarez R.A., Ramirez R.R., Lopez-Munoz J., Lera M., and Kozlowski P.K. (1998): Molecular cloning and expression of the cDNA for the heterotrimeric G protein  $\beta\gamma$  subunit  $\beta 1$ . *J Biol Chem* 273:776-781.
- DeLorenzo A.L., Lora N., Kurose F., Princi D., and Cohen P. (1996): Effect of different G protein-coupled receptor ligands on phosphoinositide 3-kinase and determination of the  $\alpha_{12}$  adrenergic receptor. *J Biol Chem* 271:10438-10444.
- DeLorenzo A.L., Lutton A., and Cohen P. (1997): Characterization of the phosphoinositide 3-kinase involved in G protein-coupled receptor kinase and protein kinase C-mediated determination of the  $\alpha_{12}$  adrenergic receptor. *J Biol Chem* 272:28712-28719.
- Ferguson S., Zhang J., Basak J., and Cohen P. (1997): Phosphorylation of GRKs and arrestins in receptor regulation. *Nat Rev* 12:145-151.
- Fukushima N., Kumura Y., and Han J. (1995): A single receptor mediated by  $\beta\gamma$  inhibits G protein to G protein and mediates multiple receptor responses to phospholipid. *J Biol Chem* 270:15151-15156.
- Garcia-Naya J.A., Romero-Ariza M.T., Ruiz-Atarés A., Ruiz-Ponte J., Aguado F., Peña S., and Cohen P. (1992): Characterization and identification of a newly prepared molecular probe for kinase C. Antigenicity of the C-terminus of protein kinase C. *J Biol Chem* 267:1241-1246.
- Gearty J.J. and Au S. (1998): Involvement of cellular receptors and turnover for the phosphoinositide 3-kinase. *J Neurochem* 70:129-139.
- Gonzalez P., Ponce M., and Tsou R. (1997): A new generation of  $\alpha_{12}$  receptors with protein-coupled protein kinase C-dependent activation. *J Biol Chem* 272:10438-10444.
- Hudson J.R., Pei J., Lissman M., and Malton T. (1992): Growth binding by  $\beta\gamma$  subunit of receptor to protein kinase C. *J Biol Chem* 267:26217-26222.
- Heerdt P.L., Verano J., Wang C., and Mullan J. (1994): Protein synthesis inhibition by staurosporine is mediated by phosphoinositide 3-kinase. The phosphorylation of  $\text{Hsp}27$  is mediated by the  $\alpha_{12}$  protein pathway. *J Biol Chem* 269:12412-12417.
- Hewlett M.J. (1991): Protein kinase C: A pivotal role for protein kinase C in modulating neuronal excitability. *Neurosci Biobehav Rev* 15:169-177.
- Kurose F. and Cohen P. (1998): The role of protein kinase C and arrestin in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:299-319.
- Lara A., Lora N., and Cohen P. (1994): Termination of the receptor-dependent response requires agonist-dependent phosphorylation and determination of the  $\alpha_{12}$  adrenergic receptor. *J Biol Chem* 269:12412-12417.
- Leim-Landberg S.M.P., Coviello N., Lomanow J.A., Hernandez J.F., Lopez-Naya J., and Cohen P. (1994): Regulation of protein kinase C by phosphoinositide 3-kinase and receptor uncoupling from isolated phospholipid membranes. *J Biol Chem* 269:12412-12417.
- Leim-Landberg S.M.P., Krueger K., and Cohen P. (1994): Mechanism of  $\beta$  adrenergic receptor desensitization and resensitization. In *Advances in Pharmacology* (Goldstein D., Eisenberg D., and Blumberg P., eds.), pp. 419-429. Academic Press, San Diego.
- Looney J.A., Zengli W.H., Fenech H.H., Adams H., Cohen P., and Parker P.J. (1998): Protein kinase C activity controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase B. *J Biol Chem* 273:12112-12118.
- Madala S.L., Varghese J., Taylor F., Falcetti M., Mendez-Morales A., Cruz-Munoz M., and Garcia-Naya J.A. (1997): Molecular characterization of  $\alpha_{12}$  adrenergic receptor: activation of formation of  $\beta\gamma$  receptors. *FEBS Lett* 423:141-145.
- Mannervik W.J., Kurose F., Postum P.T., and Cohen P. (1997): Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 272:10438-10444.
- Nakamura H., Horiuchi K.A., and Eaton J.C. (1993): Activation of the  $\alpha_{12}$  subunit of protein kinase C by phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 268:12-18.
- Neyens G.M. and Dufresne M. (1996): Intracellular signaling by phospholipid-dependent protein kinase C. *J Biol Chem* 271:11128-11133.
- Neyens G.M., Frenkelman N.E., and Leim-Landberg S.M.P. (1999): G protein-coupled receptor kinase. *FEBS Lett* 457:301-302.
- Ramirez R.R. and Cohen P. (1999): The role of phosphoinositide 3-kinase lipid product in cell function. *J Biol Chem* 274:6261-6263.

- Bakera ED, Fish F, Mawlach CR, Meade B and Zhang Y (1993) Pertussis toxin affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **268**:1644-1648.
- Stephens L, Anderson K, Saitoh D, Erdmann Brenner H, Purrier CP, Holness AR, Gardner PR, Hume CR, McIntosh F, Travers P, Campbell J and Herbison PT (1990) Protein kinase B kinase that mediate phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent activation of protein kinase B. *Science* **249**:738-740.
- van Corven EJ, Grommek A, Jalink N, Erblich T and Montmarquet WH (1994) Lysophosphatidate-induced cell proliferation, identification and association of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* **80**:63-69.
- van Corven EJ, Havelik PL, Montmarquet WH, Bos JL and Montmarquet WH (1993) Pertussis toxin sensitive activation of p115 by G protein coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:1217-1221.
- Vannoy Prade J, Medina LC and Garcia-Saiz JA (1997) Activation of endothelin ET<sub>A</sub> receptors induce phosphorylation of  $\alpha_1$  adrenoceptors in rat 1. *Characterization* **27**:2730-2737.
- Winkler T and Jakobs KH (1994) Measurements of receptor-stimulated phosphoinositide 3-O-gamma-thioetherphosphate binding by G proteins in *Methods in Enzymology* (Vuong B ed) pp 9-13. Academic Press, London.
- Wu D, Katz A, Lu W, Hsu H and Simon MI (1992) Activation of phosphoinositide C by  $\alpha_1$  adrenoceptor receptors is mediated by the  $\alpha$  subunit of Gq family. *J Biol Chem* **267**:25796-25802.
- Wu D, Jiang H and Simon MI (1993) Different  $\alpha_1$  adrenoceptor subtypes require by activating different G-subunits of Gq protein. *J Biol Chem* **268**:2436-2442.
- Wyman MP and Fowlie I (1976) Structure and function of phosphoramidate 3 kinase. *Biochim Biophys Acta* **436**:127-150.

Revised reprint requests to J. Adell, Garcia-Saiz, M.D., Ph.D., Inst. Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 70-248, México, D.F. 04510. E-mail: garsaiz@fisiologia.unam.mx





**Fig. 9. Unión de [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S *in vitro* a membranas de células tratadas con PTX.** Las células fueron incubadas en ausencia o presencia de 0.3 μg/ml de toxina y se obtuvieron membranas. La unión de [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S *in vitro* a membranas se realizó en ausencia de estímulo (basal) o en presencia de norepinefrina 10 μM (NE) o LPA 1 μM (LPA). En la gráfica se muestra el promedio y el error estándar de 10-12 determinaciones usando membranas obtenidas de 2 cultivos diferentes.

## DISCUSIÓN

---

Con el paso del tiempo han sido definidas las vías que una célula utiliza para controlar una gran variedad de funciones biológicas estimuladas a través de receptores acoplados a proteínas G. La complejidad en la regulación de las vías de transducción de señales incrementa aún más si se considera que en la mayor parte del tiempo una célula tiene que responder a varios estímulos a la vez, activando así una o más vías para poder adaptarse a todos los cambios de su medio ambiente. A este respecto, en nuestro laboratorio es de particular interés el estudio de los receptores adrenérgicos y en fechas recientes los estudios se han enfocado en tratar de dilucidar los diferentes mecanismos por los cuales la respuesta  $\alpha_1$ -adrenérgica puede ser regulada.

En este trabajo investigamos, en fibroblastos rat-1, la vía de señalización asociada a los receptores para LPA (expresados de manera endógena en estas células) mediante la cual regulan la respuesta  $\alpha_{1B}$ -adrenérgica. Aquí presentamos evidencias de que la activación de los receptores para LPA induce la fosforilación y desensibilización de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos, indicando también la participación de la PKC y la PI3K en la vía de transducción del receptor para LPA, el cual se acopla a proteínas G sensibles a toxina *pertussis* del tipo  $G_i$ .

El LPA se ha caracterizado por ser un mensajero multifuncional en muchos sistemas. Este fosfolípido parece actuar en diferentes sistemas celulares de manera autocrina, paracrina y también como mensajero intracelular, teniendo como proteínas blanco: la adenilato ciclasa, fosfolipasas, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), proteínas cinasas que participan en la reorganización del citoesqueleto, etc., y empleando diferentes vías de señalización (Moolenaar, 1995a y 1995b). Además, se ha demostrado mediante el uso de la toxina *pertussis* que la diversidad de los efectos celulares es parcialmente un resultado del acoplamiento entre el receptor para LPA y múltiples clases de proteínas G heterotriméricas, lo cual ha sido elegantemente dilucidado a través de varios trabajos del grupo de Moolenaar (Jalink *et al.*, 1990; Van Corven *et al.*, 1993).

Los datos obtenidos en este estudio indican que la activación de los receptores para LPA incrementa considerablemente el estado de fosforilación basal de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos, y que dicha fosforilación provoca la desensibilización de los mismos. Coincidiendo con algunos trabajos en los que diversos grupos demuestran la participación de proteínas  $G_i$  en importantes efectos del LPA, en este trabajo encontramos que la toxina *pertussis* bloqueó el efecto del LPA sobre la fosforilación y desensibilización del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico. Este dato marcó el primer punto relevante en lo

---

que se refiere a la regulación de la respuesta  $\alpha_{1b}$ -adrenérgica, debido a que representa el primer ejemplo donde un receptor acoplado a una proteína G<sub>i</sub> modula el estado funcional de los receptores  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos. Al respecto, se sabía que la actividad de los receptores  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos podía ser regulada por fosforilación debida a: 1) la propia activación del receptor donde principalmente participaban miembros de la familia de los GRKs (Lattion *et al.*, 1994; Diviani *et al.*, 1996); 2) la activación directa de la PKC con ésteres de forbol (Corvera y García-Sáinz, 1984; Leeb-Lundberg *et al.*, 1985; Corvera *et al.*, 1986) y 3) la activación de otros receptores acoplados a proteínas G<sub>q</sub>, insensibles a toxina *pertussis* (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). Lo anterior difiere totalmente con lo encontrado en este trabajo, indicando que se trata de una nueva vía por la cual la respuesta  $\alpha_{1b}$ -adrenérgica puede ser regulada.

Por otra parte, existen numerosas evidencias que indican que la PKC juega un papel importante en la fosforilación del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico (Leeb-Lundberg *et al.*, 1985; Bouvier *et al.*, 1987). En este estudio encontramos que la fosforilación de los receptores  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos estimulada por el LPA, se bloqueó casi completamente por el efecto de diferentes inhibidores específicos de la PKC (estaurosporina, bisindolilmaleimida I y Ro 31-8220), demostrando también la participación de esta cinasa en el proceso de desensibilización del receptor adrenérgico por efecto del LPA. De igual forma, el bloqueo de las acciones del

---

LPA con otros inhibidores de cinasas (wortmanina y LY 294002), sugiere que la PI3K está involucrada en estos procesos que sufre el receptor  $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico. La participación de la PI3K viene a ser otra contribución importante del presente trabajo, mostrando así una nueva vía para regular la función de los receptores  $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgicos.

El hecho de que se observe una inhibición prácticamente total del proceso de fosforilación de los receptores  $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgicos en presencia de los inhibidores de la PI3K y de los inhibidores de la PKC, nos sugiere que dichas cinasas pudieran estar actuando de forma secuencial en una misma vía de señalización, dirigida a modular la respuesta  $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgica.

En lo que se refiere a la PI3K, como se menciona en la introducción, la clase I de esta familia de cinasas se subdivide con base en su modo de regulación en la clase  $I_A$ , las que se asocian a receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina, y las de la clase  $I_B$ , que son activadas por receptores acoplados a proteínas G. La isoforma PI3K $\gamma$ , miembro de esta última clase, interacciona con proteínas G heterotriméricas a través de su subunidad p110, la cual no une adaptadores p85 como en el caso de las PI3Ks de la clase  $I_A$ , sino que se asocia a una subunidad no catalítica denominada p101 (Stephens *et al.*, 1997), aunque existen evidencias que indican que las proteínas G son capaces de estimular a p110 $\gamma$  en ausencia de p101, tanto *in vivo* como *in vitro* (Stoyanov *et al.*, 1995; Kular *et al.*,

1997; Lopez-Illasaca *et al.*, 1997; Tang y Downes, 1997). Existen datos reportados que indican que  $G\beta\gamma$  parece ser el estímulo fisiológico dominante para activar a  $p110\gamma$ . En otros estudios,  $p110\gamma$  se ha identificado como la proteína blanco de los complejos  $G\beta\gamma$  provenientes de proteínas G sensibles a toxina *pertussis* y se ha sugerido como un vínculo entre receptores acoplados a proteínas G<sub>i</sub> y la vía de la MAPK (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997). Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la PI3K juega un importante papel asociando a un receptor acoplado a una proteína G<sub>i</sub> (el receptor para LPA) con la vía de señalización del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico (el cual se acopla a una proteína G<sub>q</sub>).

Con base en resultados publicados, podemos sugerir que en esta vía de señalización la PKC pudiera estar siendo estimulada después de la activación de la PI3K. Recientes estudios indican que algunos fosfoinosítidos pueden activar directamente ciertas isoformas de la PKC, así como a otra proteína cinasa de residuos de serina/treonina, la PKB (Nakanishi *et al.*, 1993; Carpenter y Cantley, 1996; Franke *et al.*, 1997). Las 11 isoformas de la PKC han sido implicadas en una multitud de procesos fisiológicos (Nishizuka, 1995), todas ellas requieren de fosfatidilserina como cofactor y se han subdividido en tres grupos de acuerdo a su perfil de activación. i) las convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ II y  $\gamma$ ) que son activadas tanto por diacilglicerol (DAG) como por calcio; ii) las novedosas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y

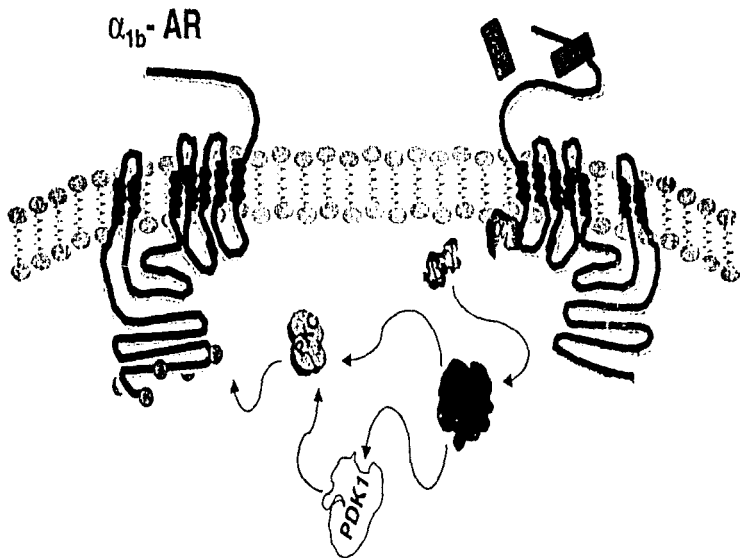
θ) que no responden a calcio pero que requieren de DAG y iii) las atípicas (ζ y λ) que no son activadas ni por DAG ni por calcio. La isoforma descubierta más recientemente, la PKC $\mu$ , también conocida como PKD, se ha propuesto que podría representar a una nueva subfamilia. De éstas, se sabe que las isoformas PKC $\epsilon$ , PKC $\delta$ , PKC $\eta$  y PKC $\zeta$  pueden ser activadas *in vitro* por los productos lipídicos de la PI3K, que son el fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato y/o el fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y/o PI(3,4)P<sub>2</sub>, respectivamente) (Nakanishi *et al.*, 1993; Toker *et al.*, 1994; Nietgen y Durieux, 1998; Wymann y Pirrola, 1998; Rameh y Cantley, 1999). Por lo tanto, el mecanismo por el cual la PI3K pudiera estimular la actividad de la PKC parece involucrar una interacción directa entre la PKC y los fosfoinosítidos generados por la PI3K.

Se ha demostrado también que la fosforilación de la PKC es un mecanismo importante mediante el cual se regula la actividad de esta cinasa (Mitchell *et al.*, 1989; Newton, 1997). Al respecto, reportes recientes han mostrado a una nueva proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1), la cual une con alta afinidad al PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, producto de la PI3K. Primeramente, esta cinasa se identificó como la cinasa que activa a la PKB, cuyo nombre deriva de su homología con la PKA y con la PKC. Se encontró que esta cinasa, la PKB, era fosforilada por la PDK-1, en una forma dependiente de PI(3,4)P<sub>2</sub> y de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, en un residuo de treonina (Thr308) localizado en el dominio de cinasa

de la proteína PKB, el cual es necesario para su fosforilación y activación. Posteriormente se encontró que la secuencia de aminoácidos alrededor de la Thr308 en la PKB estaba conservada en todos los miembros de las proteínas cinasas de residuos de serina y treonina (quinasas AGC), entre ellos, la PKC. Además, se encontró que en las células estos residuos homólogos de las cinasas AGC podían ser fosforilados después de un determinado estímulo bajo condiciones apropiadas. Estos descubrimientos sugirieron que las cinasas AGC eran activadas por un mecanismo análogo al de la PKB. Más tarde se identificó a la PDK-1 como la cinasa responsable de la fosforilación y la activación de varias isoformas de la PKC (Le Good *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1998) en vías de señalización donde participa la PI3K. La fosforilación *in vitro* de la PKC por la PDK-1 aumenta en presencia de  $PI(3,4,5)P_3$ . Por lo tanto, la PDK-1 podría representar otro mecanismo mediante el cual la PI3K podría estimular la activación de la PKC y la consecuente regulación de la respuesta  $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgica.

Finalmente, reuniendo los datos generados de este estudio podemos sugerir el siguiente modelo para la regulación de la respuesta  $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgica (Fig. 10): a) al unirse el LPA a sus receptores provoca la activación de los mismos, los cuales se acoplan a proteínas G sensibles a toxina *pertussis* del tipo  $G_i$ , b) al ser activadas las proteínas G heterotriméricas, se separa el complejo  $G\beta\gamma$  de la subunidad  $G\alpha$ . Por su parte, el dímero  $G\beta\gamma$





**Fig. 10. Representación esquemática del mecanismo propuesto para la regulación de la respuesta  $\alpha_{1b}$ -adrenérgica por LPA.**

$\alpha_{1b}$ -AR, receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico; LPA, ácido lisofosfatídico;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , proteínas Gi heterotrímicas; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PDK1, proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos; PKC, proteína cinasa C.

podría entonces estimular la actividad de la PI3K, lo cual llevaría a, c) la activación de la PKC ya sea mediante la interacción con fosfoinosítidos (productos de la PI3K), o por fosforilación mediada por la PDK-1 y d) finalmente, la PKC cataliza la fosforilación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico provocando también su desensibilización.

Podemos concluir entonces que el LPA induce la fosforilación de los receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos a través de un mecanismo dependiente de PI3K y PKC mediante la activación de proteínas G<sub>i</sub>. El proceso de fosforilación del receptor provoca el desacoplamiento entre el receptor adrenérgico y su proteína G. Por lo tanto, estamos hablando de una nueva vía a través de la cual se puede regular la respuesta  $\alpha_{1B}$ -adrenérgica, la cual difiere de las hasta ahora reportadas, incluyendo: desensibilización homóloga que es inducida por el agonista y la desensibilización heteróloga mediada por receptores acoplados a proteínas G del tipo G<sub>q/11</sub>, como es el caso de los receptores para endotelina.

## PERSPECTIVAS

---

Los datos presentados en este trabajo muestran que la activación de los receptores para LPA regula la vía de señalización del receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico a través de proteínas  $G_i$ , proteína cinasa C y PI3K, lo cual representa una importante contribución al evidenciar una nueva vía por la cual la respuesta  $\alpha_{1b}$ -adrenérgica puede ser regulada.

Algunas de las perspectivas del presente trabajo son: 1) comprobar la participación de los complejos  $G\beta\gamma$  de las proteínas  $G_i$  en la activación de la PI3K y 2) determinar la(s) isoforma(s) de la PI3K involucrada(s) en este proceso, todo ello con el fin de completar la vía de transducción empleada en este tipo de intercomunicación de los receptores involucrados.

Como se menciona en la introducción, existen 3 clases de la PI3K; los miembros de la clase I que son heterodímeros formados por una subunidad catalítica de 110 kDa y una subunidad adaptadora, se han subdividido en la clase  $I_A$  (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ ) y la clase  $I_B$  (p110 $\gamma$ ) dependiendo de la proteína adaptadora involucrada, la cual puede ser una subunidad denominada p85 que interacciona con tirosinas fosforiladas de los receptores con actividad intrínseca de cinasa de residuos de tirosina, en el caso de la clase  $I_A$  o una subunidad p101 para la clase  $I_B$ , que junto con la subunidad p110 $\gamma$  pueden ser activadas por complejos  $\beta\gamma$  de las proteínas G a través de receptores de

---

siete dominios transmembranales (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Wymann y Pirola, 1998). Sin embargo, algunos grupos han reportado que existen ligandos que activan proteínas G heterotriméricas y estimulan la actividad de las PI3Ks de la clase I $\alpha$  (Thomason *et al.*, 1994; Ptasznik *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996). Esto puede deberse a que la activación de receptores acoplados a proteínas G puede inducir la estimulación de los receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosinas (Grinstein y Furuya, 1991; Weiss *et al.*, 1997; Luttrell *et al.*, 1996). Por otro lado, parece que la PI3K $\beta$  puede ser directamente activada por complejos G $\beta\gamma$  *in vitro* y no así la PI3K $\alpha$  ni la PI3K $\delta$  (Kurosu *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 1999). De igual forma, se ha detectado actividad de la PI3K en respuesta a complejos G $\beta\gamma$  en células que no expresan niveles detectables de la PI3K $\gamma$  (Stephens *et al.*, 1994). Por lo tanto, es necesario establecer la contribución de las PI3Ks de la clase I $\alpha$  en la señalización de los receptores acoplados a proteínas G.

Dado que en este trabajo se sugiere que la activación de la PI3K se da como consecuencia de la liberación de los dímeros  $\beta\gamma$  de las proteínas G $_i$  al activar a los receptores para LPA, primero se comprobará la participación de dichos complejos G $\beta\gamma$  en la activación de la PI3K.

Actualmente está bien documentado que el dímero  $\beta\gamma$  regula diversas proteínas uniéndose a ellas a través de dominios PH contenidos en dichas proteínas (Touhara *et al.*, 1994; Gaudet

*et al.*, 1996). Por ejemplo, se han identificado este tipo de dominios que interaccionan físicamente con  $\beta\gamma$  en proteínas tales como la  $\beta$ ARK1 y la  $\beta$ ARK2 (Koch *et al.*, 1993), las cuales pueden ser reguladas por el dímero  $\beta\gamma$ . Por lo anterior, la sobre expresión de este tipo de dominios se ha utilizado como una herramienta para identificar acciones dependientes del dímero  $\beta\gamma$ , ya que estos dominios de unión para  $\beta\gamma$  pueden actuar como antagonistas cuando se expresan en células intactas y pueden inhibir la activación de proteínas dependiente de  $\beta\gamma$  (Koch *et al.*, 1994). Por lo tanto, planeamos secuestrar al dímero  $\beta\gamma$  y observar si se bloquea la activación de la PI3K utilizando un cDNA que codifica para los últimos 195 aminoácidos del extremo carboxilo de la  $\beta$ ARK1, donde se encuentra el dominio de unión para  $\beta\gamma$ . Este polipéptido está clonado en un vector de expresión denominado pRK5, constituyendo el plásmido pRK- $\beta$ ARK1-(495-689), que junto con el vector vacío nos fueron amablemente donados por el Dr. W. J. Koch de la Universidad de Duke.

Con lo anterior se planteó la siguiente estrategia experimental: 1) propagar el plásmido pRK- $\beta$ ARK1-(495-689) en *E. coli* mediante transformación con  $\text{CaCl}_2$ ; 2) purificar el plásmido a través de lisis alcalina y utilizando una resina de intercambio aniónico; 3) transfectar de manera transitoria a los fibroblastos rat-1 con el plásmido pRK- $\beta$ ARK1-(495-689); 4) demostrar la expresión celular del polipéptido mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo específico dirigido contra la  $\beta$ ARK1 y 5)

---

realizar los experimentos de fosforilación e inmunoprecipitación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico utilizando las células transfectadas.

En lo que respecta a la transfección de los fibroblastos rat-1, inicialmente se utilizó el método de transfección mediante fosfato de calcio. Los experimentos iniciales se realizaron con las siguientes condiciones: 2  $\mu\text{g}$  del plásmido y cultivos con un 40-50% de confluencia que se incubaron con el medio de transfección durante 4 horas. Estas condiciones provocaron un gran índice de mortandad celular. Posteriormente se probaron los siguientes estados de confluencia: 50, 80 y 100%, así como también se probaron diferentes tiempos de incubación de las células con los complejos de DNA-fosfato de calcio, que fueron de 2 y 4 horas. En todas las condiciones probadas se obtuvieron los mismos resultados, un elevado índice de muerte celular que alcanzaba el 100% a las 48 horas.

Posteriormente, se probó el método de transfección con DEAE-Dextran, con las siguientes condiciones: cultivos celulares con un 70 y un 100% de confluencia, 1  $\mu\text{g}$  de DNA y 2,5 horas de incubación de las células en el medio de transfección. Los resultados obtenidos con el método con DEAE-Dextran fueron similares a los obtenidos utilizando fosfato de calcio.

---

Debido a la alta toxicidad de ambos métodos, se optó por un método menos agresivo, utilizando lípidos catiónicos que forman pequeños liposomas cargados positivamente, lo cual provoca que el DNA se una de manera espontánea a los liposomas y de igual forma éstos se unen a las cargas negativas de la membrana celular. Se probaron 3 reactivos de dos diferentes casas comerciales: Lipofectina y Lipofectamina de Gibco BRL y Polifectina de Biontex; estos reactivos ofrecen la ventaja de que el proceso de transfección puede llevarse a cabo en presencia de suero, lo cual era importante dada la susceptibilidad de las células a sufrir daño considerable durante el proceso de transfección.

Para los 3 reactivos se siguieron las instrucciones indicadas por sus proveedores. Dentro de las variantes que se probaron para obtener las condiciones óptimas de transfección fueron:

1.- Se varió la cantidad del lípido manteniendo constante el número de células y la cantidad de DNA para determinar la relación óptima de DNA/lípido.

2.- Se varió la cantidad de DNA manteniendo constante el número de células y la relación DNA/lípido establecida en el paso anterior, para determinar la cantidad óptima del complejo DNA/lípido.

3.- Se repitieron los pasos 1 y 2 utilizando 3 distintos grados de confluencia para las células, éstos fueron desde un 40-50, 70-80 y 100%.

---

4.- Se repitieron los pasos anteriores utilizando medio con y sin suero durante el proceso de transfección.

Las condiciones óptimas se determinaron utilizando un gen reportero que expresa una proteína fácilmente detectable y que no se encuentra en las células que empleamos, el gen de la  $\beta$ -galactosidasa cuya detección es por colorimetría .

El primer reactivo que se utilizó fue lipofectina, con el cual se observó un menor grado de toxicidad y una eficiencia de transfección de apenas un 5%. Posteriormente se utilizó lipofectamina con el que se obtuvo una mejor viabilidad celular, sin embargo, la eficiencia de transfección siguió siendo baja, de ~15%. Finalmente se probó polifectina obteniendo un mínimo efecto de toxicidad y una eficiencia máxima de transfección del 30%.

Debido a la baja eficiencia de transfección con los fibroblastos rat-1, se decidió cambiar a una línea celular que fuera más resistente al proceso de transfección y con la cual se pudiera obtener una elevada eficiencia de transfección. Se decidió entonces utilizar células COS-1, una línea celular de riñón de mono que ofrece las ventajas arriba señaladas. Utilizando el método de transfección con DEAE-Dextran se obtuvo una eficiencia de transfección de ~60% utilizando las células con un 90-100% de confluencia, 3  $\mu$ g de DNA para una caja de cultivo de 100 mm e incubando durante 2.5 horas las células con el medio de transfección. Estas células expresan de



manera endógena a los receptores para LPA y no tienen receptores adrenérgicos por lo cual el siguiente paso fue transfectarlas con un plásmido que contiene el cDNA que codifica para el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico de hámster. Resultados preliminares han indicado que en células transfectadas se logra inmunoprecipitar a este receptor, el cual se encuentra fosforilado en condiciones basales y dicha fosforilación se incrementa al incubar las células con norepinefrina o con LPA; este efecto no se observa en las células silvestres. Actualmente se están mejorando las condiciones para los lavados del inmunoprecipitado, así como las condiciones de la electroforesis que nos permitan obtener una mejor definición de la banda correspondiente al receptor. En los experimentos realizados a la fecha hemos logrado una eficiente transfección e inmunoprecipitación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico; sin embargo, la detección de la banda correspondiente al receptor en geles de poliacrilamida se ha dificultado debido a que se obtienen agregados que no permiten una adecuada cuantificación de la proteína fosforilada.

Una vez probado el sistema, esto es, verificar que en estas células el LPA cause la fosforilación y desensibilización del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, el siguiente paso será transfectar con el plásmido que contiene el cDNA del extremo carboxilo de la  $\beta$ ARK1 y estudiar el efecto que ejerce sobre la fosforilación del receptor adrenérgico mediada por LPA, una vez que se

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

---

compruebe la expresión del polipéptido mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra la  $\beta$ ARK1. Se han realizado ya algunos experimentos transfectando con este plásmido, sin embargo, aún no tenemos datos claros debido a los problemas para cuantificar la banda correspondiente al receptor adrenérgico.

Por otra parte, actualmente contamos con diferentes plásmidos que contienen el cDNA de la PI3K $\gamma$  (clase Ia) y de la subunidad adaptadora p85 (de las PI3Ks de la clase Ia), así como de sus mutantes dominantes negativas, con los cuales se tiene planeado transfectar estas células COS-1 con el propósito de identificar el tipo de la PI3K que está participando en esta vía de señalización. La expresión de estas proteínas se probará también mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra cada una de las isoformas de la PI3K.

Estos experimentos nos permitirán demostrar en forma concluyente la participación de la PI3K y su modo de activación en la regulación de la respuesta  $\alpha_{1B}$ -adrenérgica, lo cual resulta de gran relevancia puesto que éste es el primer reporte que muestra la participación de esta cinasa en una vía de regulación heteróloga entre receptores de siete dominios transmembranales.

## REFERENCIAS

- Ahliquist, R. P. (1948) *Am. J. Phys.* **153**: 583-600
- Ambrose, C., James, M., Barnes, G., Lin, C., Bates, G., *et al.*, (1992) *Hum. Mol. Genet.* **1**: 697-703
- Anant, J. S. & Fung, B. K. (1992) *Biophys. Res. Commun.* **183**: 468-473
- Arriza, J. L., Dawson, T. M., Simerly, R. B., Martin, L. J., Caron M. G., *et al.* (1992) *J. Neurosci.* **12**: 4045-4055
- Attramadal, H., Amiza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., *et al.*, (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 17882-17890
- Barry, S. T. & Critchley, D. R. (1994) *J. Cell Sci.* **107**: 2033-2045
- Benovic, J. L. & Gomez, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 19521-19527
- Benovic, J. L., De Blasi, A., Stone, W. C., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1989) *Science* **246**: 235-240
- Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I. & Codina, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8879-8882
- Benovic, J. L., Onorato, J. J., Arriza, J. L., Stone, W. C., Lohse, M., *et al.*, (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 14939-14946
- Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 7094-7101
- Berman, D. M., & Gilman, A. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**(3): 1269-1272
- Berthelsen, S. & Pettinger, W. A. (1977) *Life Sci.* **21**: 595
- Birnbaumer, L. (1992) *Cell* **71**: 1069-1072
- Birnbaumer, L. & Birnbaumer, M. (1995) *J. Rec. Signal Transduct. Res.* **15**: 213-252

- Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Biasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1988) *Nature* **333**: 370-373
- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L. M., Benovic, J. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 3106-3113
- Bünemann, M., Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Roseberry, A. G. & Hosey, M. M. (1999) *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 169-192
- Carozzi, A. C., Camps, M., Gierschik, P. & Parker, P. (1993) *FEBS Lett.* **315**(3): 340-342
- Carpenter, C. L. & Cantley, L. C. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:153-158.
- Carty, D. J., Padrell, E., Codina, J., Birnbaumer, L., Hildebrandt, J. D. & Lyengar, R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**(11): 6268-6273
- Clark, R. B., Friedman, J., Prasad, N. & Ruoho, A. E. (1985) *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res.* **10**: 97-119
- Clark, R. B., Kunkel, M. W., Friedman, J., Goka, T. J. & Johnson, J. A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1442-1446
- Corvera, S. & Garcia-Sáinz, J. A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**: 1128-1133
- Corvera, S., Schwarz, K. R., Graham, R. M. & Garcia-Sainz, J. A. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 520-526
- Craft, C. M. & Whitmore, D. H. (1995) *FEBS Lett.* **362**: 247-255
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F. & Gutkind, J. S. (1994) *Nature* **369**: 418-420
- Chen, C. Y., Dion, S. B., Kim, C. M., Benovic, J. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 7825-7831
- Chen, C-K, Inglese, J. Lefkowitz, R. J. & Hurley, J. B. (1995c) *J. Biol. Chem.* **270**: 18060-18066
- Chen, J., DeVivo, M., Dingus, J., Harry, A., Li, J., Sui, J., Carty, D. G., Blank, J. L., Exton, J. H., Stoffel, R. H., *et al.* (1995) *Science* **268**(5214): 1166-1169
- Chen, J., Makino, C. L., Peachey, N. S., Baylor, D. A. & Simon, M. I. (1995b) *Science* **267**: 374-377

Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S. & Toker, A. (1998) *Curr. Biol.* **8**: 1069-1077

Chuang, D. M. & Costa, E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3024-3028

Chuang, D-M., Kinnier, W. J., Farber, L. & Costa, E. (1980) *Mol. Pharmacol.* **18**: 348-355

Chuang, T. T., LeVine, H. III, & De Blasi, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 18660-18665

Chuang, T. T., Paolucci, L., & De Blasi, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 28691-28696

Chun, J., Contos, J. J. & Munroe, D. (1999) *Cell Biochem. Biophys.* **30**: 213-242

Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della Rocca, G. J., Ferguson, S. S., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 685-688

DebBurman, S. K., Ptasienski, J., Benovic, J. L. & Hosey, M. M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 22552-22562

DebBurman, S. K., Ptasienski, J., Boetticher, E., Lomasney, J. W., Benovic, J. L. & Hosey, M. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 5742-5747

Dickenson, J. M. & Hill, S. J. (1993) *Br. J. Pharmacol.* **110**: 1449-1456

Diviani, D., Lattion, A-L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J. L., Cotecchia, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 5049-5058

Dohlman, H. G., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1987) *Biochemistry* **26**: 2657-2664

Dolph, P. J., Ranganathan, R., Colley, N. J., Hardy, R. W., Socolich, M. & Zuker, C. S. (1993) *Science* **260**: 1910-1916

Domin, J., Pages, F., Volinia, S., Rittenhouse, S. E., Zvelebil, M. J., Stein, R. C. & Waterfield, M. D. (1997) *Biochem. J.* **326**: 139-147

Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I. & Moolenaar, W. H. (1993) *Biochem. J.* **291**: 677-680

- Ferguson, S. S. G., Barak, L. S., Zhang, J. & Caron, M. G. (1996) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**: 1095-1110
- Ferguson, S. S. G., Ménard, L., Barak, L. S., Koch, W. J., Colapietro, A.-M. & Caron, M. G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 24782-24789
- Ferguson, S. S., Downey, W. E. Jr., Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L. & Caron, M. G. (1996b) *Science* **271**: 363-366
- Ferguson, S., Zhang, J., Barak, L. S. & Caron, M. G. (1997) *News Physiol. Sci.* **12**: 145-151
- Fourcade, O., Simon, M. F., Viode, C., Rugani, N., Leballo, F., Ragab, A., Fournie, B., Sarda, L. & Chap, H. (1995) *Cell* **80**: 919-927
- Franke, T. F., Kaplan, D. R. & Cantley, L. C. (1997) *Cell* **88**: 435-437.
- Freedman, N. J. & Lefkowitz, R. J. (1996) *Recent. Prog. Horm. Res.* **51**: 319-351
- Freedman, N. J., Liggett, S. B., Drachman, D. E., Pei, G., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 17953-17961
- Fruman, D. A., Meyers, R. E. & Cantley, L. C. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 481-507
- Fukushima, Y., Asano, T., Takata, K., Funaki, M., Ogihara, T., Anai, M., Tsukuda, K., Saitoh, T., Katagiri, H., Aihara, M., Matsuhashi, N., Oka, Y., Yazaki, Y. & Sugano, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 19464-19470
- García-Sáinz, J. A. (1995) *Arch. Med. Res.* **26**: 205-212
- Garland, A. M., Grady, E. F., Lovett, M., Vigna, S. R. & Frucht, M. M. (1996) *Mol. Pharmacol.* **49**:438
- Gaudet R., Bohm A. & Sigler P. B. (1996) *Cell* **87**: 577-588
- Gilman, A. G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 615-649
- Goodman, O. B. Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. & Benovic, J. L. (1996) *Nature* **383**(6599): 447-450
- Grinstein, S. & Furuya, W. (1991) *Am.J. Physiol.* **260**: C1019-C1027
- Gurevich, V. V. & Benovic, J. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 11628-11638

- Gurevich, V. V., Benovic, J. L. (1995b) *J. Biol. Chem.* **270**: 6010-6016
- Gurevich, V. V., Dion, S. B., Onorato, J. J., Ptasienski, J., Kim, C. M., Sterne-Marr, R., Hosey, M. M., Benovic, J. L. (1995a) *J. Biol. Chem.* **270**: 720-731
- Gurevich, V. V., Richardson, R. M., Kim, C. M., Hosey, M. M. & Benovic, J. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 16879-16882
- Hadcock, J. R., Port, J. D., Gelman M. S. & Malbon, C. C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 26017-26022
- Haga, K. & Haga, T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 2222-2227
- Hamm, H. E. & Gilchrist, A. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**(2): 189-196
- Harden, T. K., Cotton, C. U., Waldo, G. L., Lutton, J. K. & Perkins, J. P. (1980) *Science* **210**:441-443
- Hargrave, P. A. & McDowell, J. H. (1992) *FASEB J.* **6**: 2323-2331
- Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 12657-12665
- Hausdorff, W. P., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990) *FASEB J.* **4**: 2881-2889
- Hepler, J. R., & Gilman, A. G. (1991) *Trends Biochem. Sci.* **17**: 383-387
- Herman, P. K. & Emr, S. D. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10**: 6742-6754
- Hertel, C., Coulter, S. J. & Perkins, J. P. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 12547-12553
- Hieble, J. P. & Bond, R. A. (1994) *Trends Pharmacol. Sci.* **15**: 397-399
- Holtmann, M. H., Roettger, B. F., Pinon, D. I. & Miller, L. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 23566-23571
- Homburger, V., Lucas, M., Cantau, B., Barabe, J., Penit J. & Bockaert, J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 10436-10444
- Houslay, M. D. (1991) *Eur. J. Biochem.* **195**: 9-27
- Howe, L. R. & Marshall, C. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 20717-20720

- Hu, Z. W., Shi, X. Y., Lin, R. Z. & Hoffman, B. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 8977-8982
- Inglese, J., Glickman, J. F., Lorenz, W., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 1422-1425
- Jalink, K., Hordijk, P. L. & Moolenaar, W. H. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1198**: 185-196
- Jalink, K., van Corven, E. J., & Moolenaar, W. H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 12232-12239
- Kieselbach, T., Irgang, K. D. & Ruppel, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* **226**: 87-97
- Kim, C. M., Dion, S. B. & Benovic, J. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 15412-15418
- Kim, D., Lewis, D. L., Graziadei, L., Neer, E. J., Bar-Sagi, D. & Clapham, D. E. (1989) *Nature* **337**(6207): 557-560
- Kleuss, C., Hescheler, J., Ewel, C., Rosenthal, W., Schultz, G. & Wittig, B. (1991) *Nature* **353**: 43-48
- Kleuss, C., Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G. & Wittig, B. (1993) *Science* **259**: 832-834
- Koch, W. J., Hawes, B. E., Allen, L. F. & Lefkowitz, R. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12706-12710.
- Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C. & Lefkowitz, R. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 8256-8260
- Koenig, J. A. & Edwardson, J. M. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.* **18**: 176-187
- Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O. & Katada, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 24252-24256
- Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A., Lefkowitz, R. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 5-8
- Krugmann, S., Hawkins, P. T., Pryer, N., Braselmann, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 17152-17158
- Krupnick, J. G. & Benovic J. L. (1998) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 289-319



- Kuhn, H., Hall, S. W. & Wilden, U. (1984) *FEBS Lett* **176**: 473-478
- Kular, G., Loubtchenkov, M., Swigart, P., Whatmore, J., Ball, A., Cockcroft, S. & Wetzker, R. (1997) *Biochem. J.* **325**: 299-301
- Kunapuli, P. & Benovic, J. L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5588-5592
- Kunapuli, P., Gurevich V. V. & Benovic, J. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 10209-10212
- Kundra, V., Anand-Apte, B., Feig, L. A. & Zetter, B. R. (1995) *J. Cell Biol.* **130**: 725-731
- Lands, A. M., Arnold, A., McAulliff, J. P., Ludvena, F. P. & Brown, J. T. G. (1967) *Nature* **214**: 597
- Langer, S. Z. (1979) *Br. J. Pharmacol.* **60**: 481
- Langhans-Rajasekaran, S. A., Wan, Y. & Huang, X. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(19): 8601-8605
- Lattion, A. L., Diviani, D., Cotecchia, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 22887-22893
- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P. & Parker, P. J. (1998) *Science* **281**: 2042-2045 (in Reports)
- Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S. & Hla, T. (1998) *Science* **279**: 1552-1555 (in Reports)
- Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., Lomasney, J. W., De Bernardis, J. F., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5651-5655
- Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., De Blasi, A., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 3098-3105
- Lefkowitz, R. J., Hausdorff, W. P. & Caron, M. G. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* **11**: 190-194
- Lenhinger, A., Nelson, D. L. & Cox, M. M. (1992): Integration and Hormonal Regulation of Mammalian Metabolism. 736-785 p. in *Principles of Biochemistry*. Second Edition, Worth Ed.

- Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R., Nurnberg, B. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 7024-7029
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J. M., Plowman, G. D., Rudy, B. & Schlessinger, J. (1995) *Nature* **376**(6543): 737-745
- Linder, M. E., Ewald, D. A., Miller, R. J. & Gilman A. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**(14): 8243-8251
- Liu, C. H., Thangada, S., Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Spiegel, S. & Hla, T. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**: 11779-11790
- Lohse, M. J. (1993) *Biochim. Biophys Acta* **1179**(2): 171-188
- Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**(12): 8558-8564
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**(6): 3202-3211
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990b) *Science* **248**: 1547-1550
- Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1095**: 127-139
- Lopez-Illasaca M., Crespo P., Giuseppe P. P., Gutkind J. S. & Wetzker R. (1997) *Science* **275**: 394-397 (in Reports)
- Lorenz, W., Inglese, J., Palczewski, K., Onorato, J. J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8715-8719
- Luttrell, L. M., Hawes, B. E., van Biesen, T., Luttrell, D. K., Lansing, T. J. & Lefkowitz, R. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**(32): 19443-19450
- Maier, U., Babich, A. & Nürnberg, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **274**: 29311-29317
- Mitchell, F. E., Marais, R. M. & Parker, P. J. (1989) *Biochem. J.* **261**: 131-136
- Moolenaar, W. H. (1995a) *J. Biol. Chem.* **270**: 12949-12952
- Moolenaar, W. H. (1995b) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 203-210
- Moolenaar, W. H. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 168-173

- Moolenaar, W. H., Bend, R. L. v., Corven, E. J. v., Jalink, K., Eichholtz, T. & Blitterswijk, W. J. v. (1992) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **57**: 163-167
- Morris, A. J., Rudge, S. A., Mahlum, C. E. & Jenco, J. M. (1995) *Mol. Pharmacol.* **48**(3): 532-539
- Nakanishi, H., Brewer, K. A. & Exton, J. H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 13-16
- Newton, A. C. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 161-167.
- Ng GYK., Trogadis, J., Stevens, J., Bouvier, M., O'Dowd, B. F. & George, S. R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10157-10161
- Nietgen, G. W. & Durieux, M. E. (1998) *Cell Adhes. Commun.* **5**: 221-235
- Nishizuka, Y. (1995) *FASEB J.* **9**: 484-496
- Nürnberg, G., Gudermann, T. & Schultz, G. (1995) *J. Mol. Med.* **73**(3): 123-132
- Onorato, J. J., Gillis, M. E., Liu, Y., Benovic, J. L. & Ruoho, A. L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 21346-21353
- Palczewski, K., Pulvermüller, A., Buczyłko, J. & Hofmann, K. P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 18649-18654
- Pals-Ryłaarsdam, R. & Hosey, M. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 14152-14158
- Pals-Ryłaarsdam, R., Xu, Y., Witt-Enderby, P., Benovic, J. L. & Hosey, M. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 29004-29011
- Paris, S., Maginaldo, I. & Pouyssegur, J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 11250-11256
- Paruti, G., Peracchia, F., Sallese, M., Ambrosini, G., Masini, M., *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 9753-9761
- Pippig, S., Andexinger, S. & Lohse, M. J. (1995) *Mol. Pharmacol.* **47**: 666-676
- Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Lohse, M. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 3201-3208

- Pitcher, J. A., Fredericks, Z. L., Stone, W. C., Premont, R. T., Stoffel, R. H. *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 24907-24913
- Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Ariza, J. L., Casey, P. J., *et al.*, (1992b) *Science* **257**: 1264-1267
- Pitcher, J. A., Payne, E. S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A. A. & Lefkowitz, R. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8343-8347.
- Pitcher, J. A., Touhara, K., Payne, E. S. & Lefkowitz, R. J. (1995b) *J. Biol. Chem.* **270**: 11707-11710
- Pitcher, J., Lohse, M. J., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992) *Biochemistry* **31**: 3193-3197
- Pitman, R. N. & Molinoff, P. B. (1980) *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res.* **6**: 421-435
- Postma, F. R., Jalink, K., Hengeveld, T., Bot A. G., Alblas, J., De Jonge, H. R. & Moolenaar, W. H. (1996) *EMBO J.* **15**: 63-72
- Premont, R. T., Inglese, J. & Lefkowitz, R. J. (1995) *FASEB J.* **9**: 175-182
- Premont, R. T., Koch, W. J., Inglese, J. & Lefkowitz, R. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 6832-6841
- Premont, R. T., Macrae, A. D., Stoffel, R. H., Chung, N. & Pitcher, J. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 6403-6410
- Pronin, A. N. & Benovic, J. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 3806-3812
- Plasznik, A., Prossnitz, E. R., Yoshikawa, D., Smrcka, A., Traynor-Kaplan, A. E. & Bokoch, G. M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 25204-25207
- Rameh, L. E. & Cantley, L. C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 8347-8350
- Reneke, J. E., Blumer, K. J., Courschesne, W. & Thorner, J. (1988) *Cell* **55**: 221-234
- Ridley, A. J. & Hall, A. (1992) *Cell* **70**: 389-399
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. & Downward, J. (1996) *EMBO J.* **15**: 2442-2451

- Ross, E. M. (1995) *Recent Prog. Horm. Res.* **50**: 207-219
- Roth, N. S., Campbell, P. T., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Lohse, M. J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6201-6204.
- Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T. & Lefkowitz, R. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 4625-4636
- Schlador, M. L. & Nathanson, N. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 18882-18890
- Schleicher, A., Kuhn, H., & Hoffmann, K. P. (1989) *Biochemistry* **28**: 1770-1775
- Schleicher, S., Boekhoff, I., Arriza, J., Lefkowitz, R. J. & Breer, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1420-1424
- Shear, M., Insel, P. A., Melmon, K. L. & Coffino, P. (1976) *J. Biol. Chem.* **252**: 7572-7576
- Sibley, D. R., Benovic, J. L., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1987) *Cell* **48**: 913-922
- Sibley, D. R., Strasser, R. H., Benovic, J. L., Daniel, E. & Lefkowitz, R. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9408-9412
- Smith, W. C., Milam, A. H., Dugger, D., Arendt, A., Hargrave, P. A. & Palczewski, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 15407-15410
- Spiegel, M. (1995) *Nature Medicine* **1**(6): 522-524
- Springer, M. S., Goy, M. F., & Adler, J. (1979) *Nature* **280**: 279-284
- Srinivasan N., Waterfield M. D. & Blundell T. L. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 697-702
- Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F. T., Jackson, T. R., Sternweis, P. C. & Hawkins, P. T. (1994) *Cell* **77**: 83-93
- Sterne-Marr, R. & Benovic, J. L. (1995) *Vitam. Horm.* **51**: 193-235
- Sterne-Marr, R., Gurevich, V. V., Goldsmith, P., Bodine, R. C., Sanders, C., et al., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 15640-15648
- Stoffel, R. H., Randall, R. R., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. & Inglesse, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 27791-27794

---

Stoyanov, B., Volinia, s., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., *et al.*, (1995) *Science* **269**: 690-693

Strasser, R. H., Stiles, G. L. & Lefkowitz, R. J. (1984) *Endocrinology* **115**:1392-1400

Strulovici, B., Cerione, R. A., Kilpatrick, B. F., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1984) *Science* **225**: 837-840

Su, Y-F., Harden, T. K. & Perkins J. P. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 38-41

Tang, W. J. & Gilman, A. (1991) *Science* **254**: 1500-1503

Tang, X. & Downes, C. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 14193-14199

Thomas, W. G., Thekkumkara, T. J., Motel, T. J., Baker, K. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 207-213

Thomason, P. A., James, S. R., Casey, P. J., & Downes, C. P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 16525-16528

Toews, M. L., Harden, T. K. & Perkins, J. P. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3553-3557

Toews, M. L., Waldo, G.L., Harden, T.K. & Perkins, J. P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**: 11844-11850

Toker, A., Meyer, M., Reddy, K. K., Falck, J. R. & Aneja, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 32358-32367

Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J. A., Shaw, G. & Lefkowitz, R. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 10217-10220

Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H., Nagao, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 32522-32527

Tsukada, S., Simon, M. I., Witte, O. N. & Katz, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(23): 11256-11260.

Ui, M. (1984) *Trends in Pharm. Sci.* **5**: 277-282

- Van Corven, E. J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. & Moolenaar, W. H. (1989) *Cell* **59**: 45-54
- Van Corven, E. J., Hordijk, P. L., Medema, R. H., Bos, J. L. & Moolenaar, W. H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1257-1261
- van der Bend, R. L., Brunner, J., Jalink, K., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H. & van Blitterswijk, W. J. (1992) *EMBO J.* **11**: 2495-2501.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. & Waterfield, M. D. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**: 267-272
- Vázquez-Prado, J., Medina, L. C. & García-Sáinz, J. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 27330-27337
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. & Brown, R. F. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 5241-5248
- von Zastrow, M. & Kobilka, B. K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 3530-3538
- Wakshull, E., Hertel, C., O'Keefe, E. J. & Perkins, J. P. (1985) *J. Cell Biol.* **29**: 127-141
- Waldo, G. L., Northup, J. K., Perkins, J. P. & Harden, T. K. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 13900-13908
- Walsh, J. H., Bouzyk, M. & Rosengurt, E. (1993) *J. Cell. Physiol.* **156**: 333-340
- Ward, S. G., June, C. H. & Olive, D. (1996) *Immunol. Today* **17**: 187-197
- Weiss, F. U., Daub, H. & Ullrich, A. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 80-86
- Wilden, U., Wust, E., Weyand, I. & Kuhn, H. (1986) *FEBS Lett* **207**: 292-295
- Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E. & Lohse, M. J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2105-2109
- Wymann, M. P. & Pirola, L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1436**: 127-150
- Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirrola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. & Panayotou, G. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1722-1733

---

Yamada, M., Jahangir, A., Hosoya, Y., Inanobe, A., Katada, T. & Kurachi, Y. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 24551-24554

Yang, J., Williams, J. A., Yufe, D. I. & Logsdon, C. D. (1995) *Mol. Pharmacol.* **48**: 477-485

Yoshida, S., Fujisawa-Sehara, A., Taki, T., Arai, K. & Nabeshima, Y. (1996) *J. Cell Biol.* **132**: 181-193

Zhang, Jin, Zhang, Jun, Benovic, J. L., Sugai, M. W., Reinhard, G., Ivan, R. & Susan E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**(12): 6589-6594