

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

1

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PARTICIPACION DE PROTEINAS FOSFATASAS
CITOPLASMICAS EN EL ESTADO DE
FOSFORILACION Y EN LA FUNCION DEL RECEPTOR
 α_{1b} -ADRENERGICO.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

M en IBB ROCIO ALCANTARA HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Eric con todo mi amor, gracias por apoyarme siempre.

A mis papás María Dolores y Ricardo por su comprensión y disposición para ayudarme incondicionalmente.

A mis hermanos Mireya, Erika, Matza, Ricardo, Arturo, y Alfonso.

A Carlitos, el más pequeño de la familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz por el apoyo que me ha brindado durante tantos años, especialmente para poder concluir esta etapa.

A los miembros del Jurado, Dra. Marietta Tuena Sangri, Dra. Rosario Muñoz Clares, Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Rafael Villalobos Molina, Dr. José Bargas Díaz, Dr. Jorge Vázquez Ramos y Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort, por sus observaciones y revisión crítica al manuscrito.

A los miembros de mi Comité Tutoral, Dra. Marietta Tuena Sangri y Dr. Enrique Ortega Soto por sus comentarios y sugerencias al trabajo realizado durante el doctorado.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por sus valiosos consejos, por sus clases, por enseñarme a escribir una revisión, por sus seminarios que enriquecieron mi formación en estos años de posgrado.

Al Dr. José Vázquez y a Dinorah Leyva Illades por su participación en algunos de los experimentos que forman parte de esta tesis.

A Maura Cárdenas García y a Patricia Casas González por compartir conmigo el trabajo, pero también su amistad.

A mis compañeros del laboratorio José, Luz del Carmen, Dinorah, Tere, Claudia, Agustín, Eréndira y Paco.

A Lupita Jiménez y a Ivonne porque gracias a su trabajo puedo cumplir con el mío.

A Lupita Pérez por su apoyo secretarial.

A Juan Manuel Barbosa y a Ivette Rosas del Departamento de Cómputo del IFC por su ayuda.

A la Dra. Laura Ongay, a Marcela Sosa y a Lupita Códiz de la Unidad de Biología Molecular del IFC.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
I.FOSFATASAS	8
Ia.Clasificación de fosfatasas de Ser/Thr	8
Ib.Estructura de las fosfatasas de Ser/Thr	8
Ic.Mecanismo de reacción de las fosfatasas	9
Id.Función de las fosfatasas de Ser/Thr en la Célula	9
Ie.Mecanismos moleculares de regulación de las fosfatasas de Ser/Thr	10
i) Metilación	11
ii) Fosforilación	12
iii) Inhibidores de fosfatasas de Ser/Thr	12
Inhibidores de origen natural	12
Inhibidores sintéticos	12
II.PROTEÍNA CINASA C (PKC)	13
IIa.Clasificación de la PKC	14
IIb.Estructura de la PKC	14
IIc.Mecanismos moleculares de regulación de la PKC	15
i) Regulación de PKC por el pseudosustrato	15
ii) Fosforilación	15
iii) Inhibición de la PKC	16
Inhibidores naturales y sintéticos de la PKC	16
Inhibición de PKC por secuencias antisentido del RNA mensajero (RNAm)	16
Activadores naturales de la PKC	17
IIId.Función de la PKC en la célula	17
III.DESENSIBILIZACIÓN DE RECEPTORES	18
i) Fosforilación del receptor	19
ii) Desacoplamiento entre el receptor y la proteína G	19
IV.COMPLEJOS MULTIPROTÉICOS	20
V.RECEPTORES ADRENÉRGICOS	22
Va.Clasificación de los receptores adrenérgicos ...	23

Vb. Características generales de los receptores adrenérgicos	23
Vc. Estructura de los receptores alfa- adrenérgicos (α 1-AR)	24
Vd. Sistemas de transducción de los α 1-AR	24
i) Sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio ..	24
ii) Sistema de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK)	24
iii) Comunicación cruzada (Cross-talk)	25
VI. ANTECEDENTES DEL TRABAJO DE TESIS	26
VII. HIPÓTESIS DE TRABAJO	27
VIII. OBJETIVOS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
IX. MÉTODOS	29
X. RESULTADOS	31
XI. DISCUSIÓN	32
XII. CONCLUSIÓN	36
XIII. PERSPECTIVAS	36
XIV. REFERENCIAS	38

ABREVIATURAS

AC; adenilato ciclasa

ADP; adenosin difosfato

AKAP; proteína adaptadora de la subunidad reguladora de la PKA

AMP; adenosin monofosfato

AMPc; adenosin monofosfato cíclico

AO; ácido okadaico

AP-2; proteína adaptadora

ATP; adenosin trifosfato

Cdc25; fosfatasa de proteínas con actividad dual, residuos de Ser/Thr y Tyr

CnA; calcineurina A o subunidad catalítica de la PP2B

CnB; calcineurina B o subunidad reguladora de la PP2B

DAG; 1,2-diacilglicerol

DARPP32; fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina de 32 kDa

EGF-R; receptor del factor de crecimiento epidermal

FI-Ca²⁺; sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio

FLC; fosfolipasa C

GAP; proteína activadora de la GTPasa

GRK; cinasa específica de receptores acoplados a proteínas G

GTP; guanosin trifosfato

IP₂; fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

IP₃; inositol 1,4, 5 -trifosfato

I-R; receptor de insulina

JAK2; cinasa de residuos de tirosina (Janus another kinase)

JNK; cinasa del amino terminal de la proteína JUN

JUN; proteína oncogénica

MAPK; cinasa activada por mitógenos

MEK; cinasa de la MAPK

NF-AT; factor nuclear de células T activadas

P56^{Lck}; cinasa de residuos de tirosina de 56 kDa de linfocitos

P60^{Src}; cinasa de residuos de tirosina descrita en el sarcoma de Rous

PDK1; cinasa de proteínas dependiente de fosfoinosítidos

PH; dominio homólogo a la plecstrina

PI-3K; cinasa de la posición 3 del anillo de inositol

PKC; cinasa de proteínas dependiente de calcio y de fosfolípidos

PKA; cinasa de proteínas dependiente de AMPc.

PLC; fosfolipasa C

PMA; éster de forbol (Phorbol-12-Mirystate-13-Acetate)

PP; fosfatasa de proteínas de residuos de serina y/o treonina

PP1; fosfatasa de proteínas de residuos de serina y/o treonina tipo 1

PP2A; fosfatasa de proteínas de residuos de serina y/o treonina del tipo 2A

PP2B; fosfatasa de proteínas de residuos de serina y/o treonina del tipo 2B

PP2C; fosfatasa de proteínas de residuos de serina y/o treonina del tipo 2C

PTP; fosfatasa de proteínas de residuos de tirosina

RACK; receptor de la PKC en su forma activada

SH; dominio homólogo a la cinasa Src

SHPTP; fosfatasa de residuos de tirosina con dominios SH2 y SH3

STAT1; factor estimulador de la transcripción

α_{1b}-AR; receptor alfa 1b adrenérgico

β₂-AR; receptor beta2 adrenérgico

RESUMEN

Los resultados del presente trabajo indican que el estado de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, sobreexpresado en células Rat-1, es regulado por la acción de cinasas y fosfatasa de proteínas.

El ácido okadaico (AO), un inhibidor selectivo de las fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A) incrementa la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. La fosforilación máxima del receptor, de aproximadamente tres veces con respecto al basal, se observa a los 30 minutos y se mantiene por 1 hora o más tiempo.

El incremento de la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico con AO es dependiente de la concentración, se obtuvo una dosis efectiva 50 (EC_{50}) de 30 nM.

El tratamiento de las células Rat-1 con otros inhibidores selectivos de la PP2A, tales como la tautomocina y la calcicolina A ($1\mu M$) y con un inhibidor selectivo de la fosfatasa tipo 2B (PP2B) la cipermetrina ($1\mu M$) también aumenta la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, la tautomocina lo hace con una magnitud similar a la producida por el AO y la cipermetrina, que resultó ser el inhibidor menos eficaz, tuvo un efecto máximo en la fosforilación de 2 veces con respecto a la fosforilación basal.

La fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico está mediada principalmente por la proteína cinasa dependiente de calcio y de fosfolípidos (PKC). Los inhibidores específicos de la PKC, tales como la estaurosporina y el Ro 318220, a una concentración de $10\mu M$, abaten la fosforilación del receptor inducida por el AO. La inhibición en ambos casos fue dependiente de la concentración del agente. Igualmente de manera dependiente de la concentración, los dos inhibidores disminuyeron significativamente la fosforilación basal del receptor.

Algunos inhibidores de otras cinasas, como por ejemplo la genistéina, un inhibidor de cinasas de residuos de tirosina y la wortmanina, un inhibidor de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI-3K) no tienen efecto sobre la fosforilación del receptor inducida por AO, ni sobre la fosforilación basal.

El análisis de coimmunoprecipitación que determina si existe asociación de dos o más proteínas muestra que las isoformas α , δ y ϵ de la PKC, expresadas en las células Rat-1, coimmunoprecipitan con el receptor α_{1b} -adrenérgico. La asociación del receptor con las isoformas α , δ y ϵ de la PKC se incrementa rápidamente pero de forma transitoria y de manera dependiente de la dosis del PMA (Phorbol-Mirystate-Acetate), un activador de la PKC permeable a la membrana plasmática. El incremento de la asociación receptor α_{1b} -adrenérgico-PKC α inducida por el PMA fue de 2.5 veces con respecto al basal, mientras que la asociación con las isoformas δ y ϵ fue de 2 veces en ambos casos. No detectamos una asociación del receptor con la isoforma ζ de la PKC.

La activación de la PKC por hormonas como la noradrenalina (NA), la endotelina-1, el ácido lisosofatídico o por el factor de crecimiento epidérmico

incrementan la asociación receptor-PKC. La magnitud de la asociación es distinta dependiendo del estímulo y de la isoforma de PKC.

La determinación de la liberación de calcio intracelular y de la producción de IP_3 en células Rat-1 como parámetros elegidos para definir el significado funcional de la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico nos indica que el pretratamiento de las células con AO (inhibición de fosfatasa) no abate la respuesta del receptor a la NA, mientras que el PMA (activación de PKC) sí bloquea la respuesta. Por otro lado, cuando las células se exponen al PMA y AO al mismo tiempo, el receptor pierde su capacidad de respuesta.

Finalmente, los resultados de la determinación de unión de [^{35}S]GTP γ S a membranas plasmáticas sugieren que la fosforilación del receptor inducida por el PMA se relaciona con su desacoplamiento de la proteína G y por tanto, con la pérdida de la respuesta al agonista. Mientras que la fosforilación como respuesta al tratamiento con AO, aún cuando disminuye parcialmente la unión total de [^{35}S]GTP γ S, no se relaciona con la pérdida de la respuesta. Es decir, el significado funcional de la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico por activación de la PKC es la desensibilización del receptor, mientras que el significado funcional de la fosforilación del receptor por la inhibición de las fosfatasa no es la desensibilización. Estos resultados sugieren que las fosforilaciones del receptor ocurren en sitios diferentes o que participan otros elementos moleculares en el proceso de desensibilización.

ABSTRACT

In summary, our results indicate that phosphorylation of the α_{1b} -adrenergic receptor in Rat-1 cells was regulated by protein kinases and protein phosphatases.

Our data indicate that α_{1b} -adrenergic receptor phosphorylation induced by okadaic acid (OA), an inhibitor of PP1 and PP2A. The effect of OA was concentration-dependent with an EC_{50} of 30 nM and the effect reached its maximum at 30 minutes, this effect remained constant up to 60 min.

Other protein phosphatase inhibitors, such as tautomycin and calyculin A at a concentration of 1 μ M, both inhibitors of PP2A, and cypermethrin, an inhibitor of PP2B, increased α_{1b} -adrenergic receptor phosphorylation of similar magnitude to that produced by OA, but cypermethrin turned out be less effective.

We observed that participates calcium-dependent protein (PKC) in α_{1b} -adrenergic receptor phosphorylation. Specific inhibitors of PKC, such as staurosporine and Ro 318220, blocked the effect of OA on receptor phosphorylation in a concentration-dependent. Staurosporine and Ro 318220 decreased basal α_{1b} -adrenergic receptor phosphorylation. This effect was concentration-dependent.

In contrast, genistein an inhibitor of protein tyrosine kinase blocked neither the basal labelling nor the effect of okadaic acid on the state of phosphorylation of the receptor, and wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K) altered neither the basal phosphorylation of the α_{1b} -adrenergic receptor nor the effect of OA.

Analysis of co-immunoprecipitation, to determine association between two or more proteins indicated that α , δ , and ϵ PKC isoforms interacted with α_{1b} -adrenergic receptors under basal conditions and such associations were increased in cells treated with PMA (Phorbol Myristate Acetate). The increased associations induced by PMA were concentration-dependent and reached their maxima 1 to 2 min after the addition of PMA. No co-immunoprecipitation of PKC ζ and α_{1b} -adrenergic receptor was detected.

Other stimulus of PKC such as noradrenaline, endothelin-1, lysophosphatidic acid and epidermal growth factor were also able to increase to association of PKC isoforms and α_{1b} -adrenergic receptor, but the magnitude of the increased association varied between 2-3-fold, depending of PKC isoforms.

Intracellular calcium increase and IP_3 production in Rat-1 cells, both parameters measured to define the functional significance of the phosphorylation of this receptor, indicated that PMA blocks the response of the α_{1b} -adrenergic receptor to noradrenaline, whereas the OA did not alter

response. When the cells were preincubated with OA and PMA no effect of noradrenaline on intracellular calcium concentration and IP_3 production was observed.

Finally, with the results of [^{35}S]GTP γ S binding to plasma membranes, we observed that the increase generated by noradrenaline was of smaller magnitude in membranes obtained from cells incubated with noradrenaline, or PMA. The OA did not alter the response of α_{1b} -adrenergic receptor.

That is to say, the functional meaning of the α_{1b} -adrenergic receptor phosphorylation by PKC activation was receptor desensitization, whereas the functional meaning of the receptor phosphorylation by the inhibition of protein phosphatases was not receptor desensitization.

These results suggest that the phosphorylations on the receptor occur in different sites or that other molecular elements participate in desensitization process.

INTRODUCCIÓN

La coordinación precisa de los distintos niveles de organización en el individuo, es decir, de células, órganos y sistemas, permite llevar a cabo un sinnúmero de funciones que contribuyen, en conjunto, a su adaptación.

Un organismo unicelular responde a cambios en su microambiente, ya sea a sustancias repelentes o a sustancias atrayentes, como sucede en las bacterias, que nadan hacia uno u otro sitio, dependiendo del tipo de sustancia que detectan en el medio (1). Por otra parte, un organismo pluricelular tiene la capacidad de responder, a la vez, a múltiples señales del ambiente que culminan en respuestas metabólicas, en división celular o en una respuesta inmune, por mencionar algunas. Así, tanto en organismos unicelulares como pluricelulares, la transmisión del primer mensajero y su amplificación intracelular determina finalmente una respuesta celular específica.

En organismos procariontes, la transducción de la señal extracelular consiste en sistemas integrados básicamente, por dos componentes, una proteína con un dominio *transmisor* que funciona como sensor de la señal, la cual tiene actividad de cinasa y se autofosforila en un residuo de histidina; y una proteína con un dominio *receptor* que tiene un residuo de aspartato que adquiere el grupo fosfato transferido, desde el residuo de histidina de su compañero transmisor (1). Estos sistemas de dos componentes regulan la expresión de genes que codifican proteínas que funcionan como reguladores de la osmolaridad y la morfogénesis en las amibas, del metabolismo del nitrógeno y la quimiotaxis en las bacterias, o del crecimiento y la esporulación en hongos (2). Se ha observado que los sistemas de dos componentes, también forman parte de la transducción de señales de varios organismos eucariontes, como algunos hongos, entre ellos las levaduras, y las plantas superiores. Además, en algunos casos como en la esporulación, por ejemplo, participan otras proteínas (1).

En un organismo multicelular, la transmisión de la señal extracelular hacia el interior de las células, así como la comunicación entre ellas, requiere de una maquinaria proteica fundamental y numerosa que trabaja coordinadamente con el fin de regular respuestas tales como la síntesis de proteínas, lípidos o carbohidratos, la proliferación, la diferenciación o la muerte celular. Dos aspectos son muy importantes para que cada célula responda con especificidad al estímulo. El primero es la gran variedad de receptores que una célula expresa, capaces de reconocer con alta selectividad a los ligandos (mensajeros primarios); y el segundo, son los componentes que participan río abajo en el interior de la célula durante la transducción de la señal extracelular (3).

Dada la complejidad de la comunicación intracelular se han definido por separado, para simplificarla, distintos sistemas de transducción, los cuales de manera general, comprenden un receptor, una proteína acopladora, una proteína efectora y la producción de moléculas conocidas como segundos mensajeros (3).

Algunos sistemas de transducción son: el de la adenilato ciclasa, el de recambio de fosfoinosítidos-calcio, el de los receptores para factores de crecimiento, el de reconocimiento al antígeno de células T y B, el de transducción de receptores tipo canal, el de receptores antiproliferativos, el de muerte celular, etcétera.

Estas vías de transducción de señales son moduladas por mecanismos postraduccionales tales como la fosforilación, la metilación, la oxidación y la proteólisis (4). El mejor estudiado es la fosforilación, dado que una gran cantidad de proteínas que forman parte de los sistemas son fosforiladas.

EL estado de fosforilación de las proteínas se mantiene en un equilibrio dinámico por la acción de dos clases de enzimas: las cinasas, aquellas que transfieren grupos fosfato a las proteínas a partir de moléculas energéticas como el ATP y, las fosfatasas aquellas que hidrolizan los enlaces monoéster liberando el fosfato unido de las proteínas (5).

Comparativamente con las fosfatasas, las características estructurales y funcionales de las cinasas se conocen con más detalle. En eucariontes se han identificado al menos 1000 genes que codifican para cinasas y únicamente 50 genes que codifican para fosfatasas (6), número que quizás sea mayor ya que el estudio de estas últimas enzimas todavía se enfrenta al problema de no contar con inhibidores específicos. No obstante, se ha logrado: 1) la clonación e identificación de genes nuevos que codifican fosfatasas y 2) la deducción precisa de su estructura por el análisis de difracción de rayos X, en particular de las enzimas que desfosforilan residuos de tirosina (PTPs) como la PTP de *Yersinia*, las PTPs de ratón con el dominio-2 homólogo a Src como SHP-1 y SHP-2 y las PTPs humanas como PTP μ , PTP1B, HCPTPA y HCPTPB estas dos últimas de bajo peso molecular, y más recientemente de la Cdc25A, una fosfatasa con actividad dual (desfosforila residuos de serina/ treonina y tirosina) (6 a 9).

En sistemas celulares de organismos superiores se sugiere que las fosfatasas tienen un papel muy importante en diversos fenómenos, por ejemplo, en la degeneración de la retina (10), en el desarrollo del cerebro (10), en el metabolismo del glucógeno, en la gluconeogénesis (11) y en la progresión del ciclo celular (12), por mencionar algunos (Tabla I). Sin embargo, la participación de las fosfatasas todavía no es completamente clara en otros fenómenos celulares, tales como la insensibilidad de los receptores a responder al estímulo (desensibilización), la activación o inhibición de cinasas y de las propias fosfatasas, la memoria, el aprendizaje o la muerte celular, pero en los cuales se ha demostrado que la fosforilación de proteínas es un mecanismo clave de regulación. Lo mismo sucede en fenómenos que son resultado de cambios en la osmolaridad, en la esporulación, en la asimilación de nitrógeno y carbono y en la quimiotaxis, observados en bacterias, levaduras y plantas (2).

Los sitios blanco de acción, tanto de cinasas como de fosfatasas de proteínas en células de mamífero se restringe principalmente a tres residuos: la serina, la treonina y la tirosina; mientras que en bacterias se restringe a la histidina y al aspartato. En diversas especies de eucariontes, entre las que se incluye a las levaduras, amibas y plantas superiores, además de la fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina, también hay fosforilación sobre residuos de histidina y aspartato. Se ha demostrado que en estos organismos existe una relación directa entre la cascada de cinasas de serina/treonina y el sistema de dos componentes (4, 5 y 6).

En los siguientes apartados mencionaré las características estructurales y funcionales de las fosfatasas (PPs) y de las cinasas de proteína dependientes de calcio y de fosfolípidos que actúan sobre residuos de serina y/o treonina (PKCs).

Tabla I.

Características de la estructura, requerimientos iónicos, inhibidores, localización y función celular de las algunas fosfatasa de residuos de serina y/o treonina de la familia PPP de células de mamífero (2, 5 y 6).

TIPO	Sustrato	Inhibidores	Iones	Subunidad catalítica	Localización	Función
PP1	Subunidad β de la cinasa fosforilasa, glucógeno sintetasa, cadena ligera de la miosina, Receptor de NMDA, cinasa S6, acetil-coenzima A carboxilasa, histonas, etc.	Inhibidor-1 Inhibidor-2 Tautomicina Heparina Glutafión oxidasa	Mn^{2+} Zn^{2+}	37 kDa Isoformas: α , β , γ y δ	Núcleo y Citosol	Contracción muscular, síntesis de proteínas, control del ciclo celular, metabolismo del glucógeno, transformación, etc.
PP2A	Subunidad α de la cinasa fosforilasa, PP2A, proteína básica de mielina, histona H1, Receptor de NMDA, β -caseína, β_2 -AR, CREB, etc	Acido okadaico Apomorfina Tautomicina	Ninguno	37 kDa Isoformas. 0, 1, 2 y PCS	Núcleo Citosol y Mitochondria	Contracción muscular, control del ciclo celular, síntesis de ácidos grasos, transformación, etc
PP2B	Subunidad α de la cinasa fosforilasa, subunidad reguladora de la PKA II, PP2B, DARPP-32, factor Tau, NF-AT, sinapsina I, caseína, histona, etc.	Ciclosporina Cipermetrina Cicloflifina Antagonistas de la CaM	Ca^{2+} Mg^{2+} Mn^{2+} Ni^{2+}	60 kDa Isoformas. A β 1, A β y A β 3 de teratocarcinoma	Citosol Núcleo Membrana Plasmática y Sinaptosomas	Activación de las células T, control de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ y de canales de K ⁺ , plasticidad sináptica, etc.
PP2C	Caseína, PK-CaM II, cadena ligera de la miosina, fosfofructo-cinasa, etc	No hay inhibidores específicos	Mg^{2+} Mn^{2+}	45 kDa Isoformas. α y β	Citosol	Regulación de la función neuronal, regulación de la gluconeogénesis, etc

CAM; proteína calcio-calmodulina, S6; subunidad 6 ribosomal, NMDA; N-metil-D-Aspartato, β_2 -AR; receptor β_2 -adrenérgico, DARPP-32; fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kDa, NF-AT; factor nuclear de células T activadas, CREB; proteína de unión al elemento regulador de AMPc.

I.FOSFATASAS

Ia. CLASIFICACIÓN DE LAS FOSFATASAS DE SERINA Y/O TREONINA DE MAMÍFERO.

A la fecha, se conocen aproximadamente 100 fosfatasa que actúan sobre residuos de serina y/o treonina. Estas fosfatasa se clasifican por criterios bioquímicos en los tipos 1, 2A, 2B y 2C agrupadas en dos familias. Desde un punto de vista filogenético las fosfatasa 1, 2A y 2B, así como PP4, PP5 y PP6 pertenecen a la familia PPP y la fosfatasa 2C, entre otras, a la familia PPM llamada así porque sus miembros dependen de magnesio (6, 10 y 11).

Ib. ESTRUCTURA.

Las PPs se caracterizan porque están conformadas por varias subunidades, siempre hay una subunidad catalítica y una o dos subunidades reguladoras (Fig.1). PP1, PP2A y PP2B tienen un motivo catalítico común con dos dominios que constan de una hoja β flanqueada por α -hélices y un dominio predominantemente de forma helicoidal.

Por ejemplo, la PP1 está formada por una subunidad catalítica C de 37 kDa que tiene varias isoformas (Tabla I) y una subunidad reguladora G que le confiere a la proteína la capacidad de relocalización en la célula, ya que ésta posee una región hidrofóbica en su extremo amino que le permite unirse directamente al glucógeno (2 y 8).

La PP2A es más compleja, ya que puede formar el heterotrímero conformado por las subunidades A, B y C de 60, 55 y 36 kDa respectivamente, y alternativamente puede asociarse a otras subunidades de 35 y 70 kDa. En células transformadas, la PP2A puede formar el heterodímero AC y otros complejos con la proteína viral T intermedia (6).

Por otro lado, la PP2B también llamada calcineurina, forma heterodímeros que constan de la subunidad catalítica A o calcineurina A de 60 kDa que une calmodulina (CnA) y de la subunidad reguladora de 19 kDa que une calcio (CnB).

La combinación de aproximadamente veinte subunidades reguladoras de las PP2A y PP2B da lugar a distintas fosfatasa, con mayor o menor especificidad por sus sustratos, además de conferirles una localización subcelular específica. Se ha observado que la actividad y alta especificidad que tiene la PP2A por sus sustratos depende en gran medida de la concentración de dichas subunidades en la célula, y es particularmente la tercera subunidad, la B, la responsable de la unión a la membrana plasmática, y por tanto, de su localización subcelular (6 y 11).

La PP2C, a diferencia de las anteriores es la más simple, se trata de un monómero de aproximadamente 45 kDa que no tiene homología con otras PPs, pero de la cual se han identificado en células de mamífero las isoformas α y β (6 y 7) (Tabla I).

A.

Subunidad catalítica (C)

Subunidades reguladoras (R)

PP1



49%

PP2A



39%

PP2B



Pro

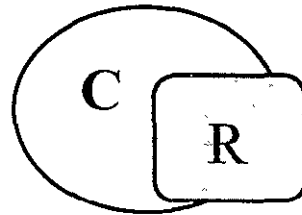
R

CaM

Inhibidor-2 (23 kDa), subunidad de unión al retículo sarcoplásmico y glucógeno (subunidad G), subunidad miofibrilar (subunidad M1), etc.

Subunidad A isoforma α (PR65), subunidad B isoformas α , β y γ , (PR52), subunidad C isoforma α (PR72), subunidad C isoformas β y B (PR130 y PR53), etc.

Subunidad B isoformas α y β , etc.



B.

Fosfatasa Tipo I (PP1)

INHIBIDORES

like-PP1

like-PP2

like-PP2B

Las tres fosfatasa de este grupo son inhibidas por proteínas resistentes al calor: Inhibidor-1 (I-1) e inhibidor-2 (I-2).

Fosfatasa Tipo II (PP2)

INHIBIDORES

PP2A; espontáneamente activa, $K_{i_{AO}} = 0.2 \text{ nM}$

Acido okadaico, Tautomicina y Caliculina A.

PP2B; dependiente de Ca^{2+} , $K_{i_{AO}} = 20 \text{ nM}$

Cipermetrina

PP2C; dependiente de Mg^{2+} , $K_{i_{AO}} = 10 \text{ } \mu\text{M}$

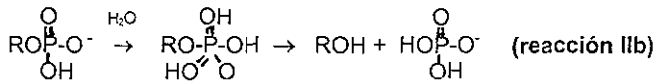
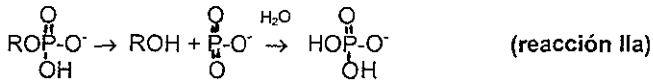
Sin inhibidores específicos

Fig.1A. La subunidad C de PP2A y PP2B de mamífero tienen 39% y 49% de similitud con respecto a la de PP1, cada subunidad C puede asociarse *in vivo* a dos o más subunidades R por lo que existe un número grande de fosfatasa, dependiendo de su composición. Fig.1B. Se indican únicamente los inhibidores de fosfatasa de residuos de serina y/o treonina empleados en este trabajo, otros inhibidores se mencionan en el texto y en la tabla III. K_i (constante de afinidad del inhibidor y la enzima) de las fosfatasa 2A, 2B y 2C por el ácido okadaico (AO)

Ic. MECANISMO DE REACCIÓN DE LAS FOSFATASAS

La principal reacción química que llevan a cabo las fosfatasa consiste en la hidrólisis de monoésteres de fosfato sobre aminoácidos específicos: tirosina, serina y/o treonina y la disociación del fósforo inorgánico de la fosfatasa completa el ciclo catalítico (reacción I).

La hidrólisis del monoéster de fosfato da como resultado la transferencia del grupo fosforilo (PO_3^-) por un mecanismo limitante disociativo (reacción IIa) o asociativo (reacción IIb). En fosfatasa de residuos de tirosina el PO_3^- del sustrato es transferido al residuo de cisteína del sitio activo de la enzima y se forma un complejo intermediario tiofosfato-enzima unido covalentemente que, en un segundo paso es hidrolizado y se forma un complejo fosfoenzima, unido de manera no covalente. Este proceso es termodinámicamente favorable con un $\Delta G < -9 \text{ kJ mol}^{-1}$, determinado a pH 7 y 25 °C (6).



Donde: ROPO_3^{2-} sustrato fosforilado, ROH es el sustrato desfosforilado.

Id. FUNCIÓN DE LAS FOSFATASAS DE SERINA Y/O TREONINA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Las fosfatasa participan en el control de múltiples funciones celulares al formar parte de diversas vías de transducción de señales. En general, las PPs median un espectro muy amplio de procesos celulares (Tabla I), mientras que las PTPs participan esencialmente en procesos de proliferación y de transformación celular (6).

La PP1 participa en la regulación del metabolismo del glucógeno al asociarse directamente a este políglucósido por medio de la subunidad reguladora. Esta enzima modula la fosforilación de la glucógeno fosforilasa, de la cinasa de la fosforilasa y de la glucógeno sintetasa, además está implicada en el control del ciclo celular, en la síntesis de proteínas, etcétera (1, 6 y 13).

Por su parte, la PP2A al desfosforilar a la L-glutamina:fructuosa-6-P-amidotransferasa regula la biosíntesis de hexosaminas, además es un regulador de la mitosis al desfosforilar a la cinasa cdc25 que actúa sobre el factor promotor de la maduración (MPF), igual que PP1 participa en la transformación celular

inducida por virus. En otros casos la PP2A participa como inhibidor de la proliferación (6).

Por otro lado, la PP2B que se expresa abundantemente en el sistema nervioso, en particular en los ganglios basales y en el hipocampo, regula la actividad de la PP1 al desfosforilar e inactivar a su inhibidor endógeno DARPP-32 ó 1-1, por lo que se ha propuesto que es indispensable en este tejido, aunque se trata de una enzima ubicua en los mamíferos (6). A la PP2B se le ha asociado con procesos neurodegenerativos ya que su expresión es muy baja en las neuronas de animales que presentan los síntomas de padecimientos como la enfermedad de Huntington y el mal de Parkinson (6). Otros estudios en este mismo tejido indican que la PP2B regula canales de calcio dependientes de voltaje y receptores de la acetilcolina. En otro sistema celular, la PP2B participa en la vía de activación de linfocitos T, uno de sus blancos es el factor nuclear de células T activadas (NF-AT), el cual se transloca al núcleo en forma desfosforilada y junto con el NF-AT nuclear activan a la ARN polimerasa e inducen la expresión de los genes de la interleucina-2 y de otras linfocinas y citocinas. Por tanto, la PP2B juega un papel central en la activación de linfocitos T (6).

El papel fisiológico de la PP2C se conoce poco, tal vez porque no existen inhibidores específicos para esta enzima. Por estudios realizados *in vitro* se sabe que la PP2C es indispensable para el control del metabolismo del colesterol ya que regula la actividad de la hidroximetil-glutaril CoA reductasa, enzima limitante de la velocidad de síntesis del esteroide (10). La PP2C también participa en la gluconeogénesis y en la contracción muscular; así como en la degeneración de la retina de los vertebrados (5, 6, 10 y 11).

1e. MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN DE FOSFATASAS DE RESIDUOS DE SERINA Y TREONINA

Las enzimas que desfosforilan proteínas en residuos de serina y/o treonina son reguladas por diversos mecanismos. La mayoría de las PPs son moduladas por su asociación con diversas subunidades reguladoras; otras son blanco de modificaciones postraduccionales y la gran mayoría de PPs de las clases 1 y 2, requieren de policationes como la protamina, las histonas, la poliisina y las poliaminas para activarse; mientras que otras moléculas como el AMP, el ADP, glucosa 1-P y fructuosa 1-P pueden inhibir su actividad. Algunos péptidos pequeños de 8 kDa derivados de la subunidad reguladora de la PP1 actúan como bloqueadores de la inhibición (6). En particular, la forma trimérica de la PP2A es modulada *in vitro* por la ceramida, el producto de la esfingomielinasa (5 y 6).

La inhibición *in vivo* de la PP2B por unión de complejos formados entre las inmunofilinas endógenas y drogas como la ciclosporina y la rapamicina, es un caso especial de regulación, que además resulta en la protección de la célula hospedera en contra de los virus (14). Lo que sucede es que la proteína viral llamada A238L forma un complejo con la calcineurina A, previniendo la consecuente activación del factor transcripcional NFAT, y por tanto, previniendo la

transcripción de genes de citocinas inmunomoduladoras-dependientes de NFAT, que se produce cuando existe una infección y que dañan a la célula huésped (15).

En otros casos, la actividad de las enzimas que desfosforilan residuos de serina y/o treonina se modula por su localización en la célula, es decir, por la proximidad a su sustrato. Un estudio realizado en el sistema nervioso muestra que la PP1 y la PP2A citosólicas son más activas que aquéllas que se encuentran asociadas a la membrana plasmática. La baja actividad enzimática de estas fosfatasas en la membrana se atribuye a la cercanía de otras proteínas que las regulan negativamente ya que actúan como inhibidores endógenos. Por ello en algunos casos, un sitio celular específico es sinónimo de una forma activa de la fosfatasa, y en otros de una forma inactiva (6 y 7). Otros mecanismos postraduccionales son también relevantes como moduladores de la actividad de las PPs: la metilación y la fosforilación.

i) METILACIÓN

Esta forma de modificación postraducciona, que se lleva a cabo por una carboximetiltransferasa, tiene un papel relevante en la regulación de la actividad de algunas PPs (6). La PP2A es activada por metilación del carbono α del residuo de leucina 309 en la región carboxilo terminal de la subunidad catalítica. Curiosamente, la secuencia Thr-Pro-Asp-Tyr-Phe-Leu, sitio donde ocurre la metilación de la PP2A se conserva desde las levaduras hasta el hombre y además, se ha observado que la metilación depende de señales extracelulares, por lo que se ha sugerido que tiene una función reguladora. También la PP2B es metilada *in vitro*, pero tiene como consecuencia la inhibición de la enzima (6).

ii) FOSFORILACIÓN

A la fecha, existe un gran número de estudios que evidencian que la fosforilación es el principal mecanismo de regulación de las PPs (Tabla II).

Dependiendo de la clase de fosfatasa, la fosforilación tiene un efecto regulador negativo o positivo sobre su actividad. Por ejemplo, la PP1 es fosforilada y activada por tres cinasas de residuos de serina y/o treonina: la PKA, la cinasa II de la caseína y la cdc2 que participa en la progresión del ciclo celular, y además, en residuos de tirosina por la cinasa v-abl. Por su parte, la PP2A es fosforilada, exclusivamente en la tirosina 307 de la subunidad catalítica por cuatro cinasas: la p60^{v-Src}, p56^{Lck} y por dos receptores que tienen actividad intrínseca de cinasa de residuos de tirosina, el receptor para el factor de crecimiento epidermal y el receptor de insulina. La consecuencia de la fosforilación sobre la PP2A es su desactivación de forma transitoria; mientras que su desfosforilación la reactiva. Además, la PP2A es fosforilada en residuos de treonina por la PKC α , hecho que se relaciona con su reactivación (5, 6 y 16).

En cuanto a las PTPs, éstas son reguladas principalmente por oxidación de un residuo de cisteína del dominio catalítico, dicha modificación se asocia con su

Tabla II.

Resumen de algunas fosfatasa de serina y/o treonina de la familia PPP de células de mamífero reguladas por fosforilación, efecto de la fosforilación sobre su actividad y cinasas que participan (2, 5 y 6).

TIPO DE FOSFATASA	RESIDUO FOSFORILADO	EFFECTO SOBRE LA FOSFATASA	CINASAS QUE PARTICIPAN
PP1	tirosina	inhibición	p60 ^{cSrc}
	serina/treonina	activación	PKA y Cinasa II de la caseína
PP2A	tirosina	inhibición	p60 ^{cSrc} , p54 ^{Lck} , R-EGF y R-I
	treonina, in vitro	inhibición	PKC α
PP2B	serina	activación	Cinasa II dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina y PKC
PP2C	No determinado	-----	-----

R-EGF; receptor del factor de crecimiento epidérmico, R-I; receptor de insulina, PKA; proteína cinasa dependiente de AMP cíclico, PKC; proteína cinasa dependiente de calcio y de fosfolípidos, p60^{cSrc}; proteína celular con actividad de cinasa de tirosinas identificada en el sarcoma de Rous de 60 kDa, p54^{LCK}; cinasa específica de linfocitos de 54 kDa. La línea punteada (----) significa sin información.

inhibición, de tal forma que se ha sugerido que el estado rédox de la célula es crítico en la regulación de esta clase de fosfatasa (17).

iii) INHIBIDORES DE FOSFATASAS DE SERINA Y/O TREONINA

Otro mecanismo de regulación de las fosfatasa es su inhibición, la PP2B, por ejemplo, se inhibe por fosfato, fluoruro y pirofosfato a concentraciones en el rango milimolar. La PP2B es inhibida por drogas inmunosupresoras cuando éstas se unen a sus receptores o inmunofilinas, además, la PP2B tiene en su estructura un dominio autoinhibitorio en el extremo carboxilo de la subunidad A que depende de iones como el calcio, el manganeso o el níquel (6).

Dado que este mecanismo de regulación es muy importante en la fisiología de estas enzimas, el empleo de inhibidores, ya sea de origen natural o sintéticos representa una herramienta farmacológica indispensable para su estudio. Muchos inhibidores de fosfatasa son permeables a la membrana plasmática y pueden bloquear su actividad en la célula intacta. Los inhibidores de origen natural son metabolitos secundarios producidos como parte de un mecanismo de defensa en contra de competidores y depredadores por diversos microorganismos tales como los dinoflagelados, bacterias, hongos, insectos y plantas. Los inhibidores sintéticos son moléculas diseñadas con base a la estructura de la proteína y a la naturaleza de las interacciones que éstas pueden formar con la enzima. Generalmente en estudios fisiológicos se emplean inhibidores reversibles, por lo que el inhibidor se asocia y disocia de la enzima dependiendo de su concentración intracelular. A una concentración alta del inhibidor la enzima se inhibe, pero ésta puede reactivarse si el inhibidor se difunde.

Sólo muy pocos inhibidores de fosfatasa endógenos se han identificado en células de mamífero, el inhibidor 1, el inhibidor 2 y DARPP-32 (Tabla III) que tienen características tanto de un inhibidor competitivo como de uno no-competitivo. En respuesta a algunos metabolitos el nivel de AMPc se incrementa en la célula, de tal manera que ambos inhibidores se fosforilan, se activan e inhiben a la PP1, es la PP2B la que los desfosforila. Por otra parte la defosforilación de los inhibidores permite su liberación de la PP1 y posteriormente la reactivación de la fosfatasa. Así, el control de PP1 por hormonas que promueven un incremento en la producción de AMPc en la célula es muy importante (6 y 13).

INHIBIDORES DE ORIGEN NATURAL

Entre los compuestos de origen natural con una alta potencia inhibidora para PP1, PP2A, PP2B y PP2C están el ácido okadaico que se trata de un ácido graso poliéter de 20 carbonos producido por dinoflagelados que se concentran en la esponja marina *Halichondra okadai*, su ingestión causa envenenamiento e incluso la muerte; la calculina A que se extrae de esponjas marinas; la microcistina (heptapéptido cíclico) y la nodularina (pentapéptido cíclico) que son toxinas producidas por cianobacterias del género *Microcystis* y *Nodularia* y la

Tabla III.

Inhibidores de fosfatasa de residuos de serina/ treonina de mamífero (6).

NOMBRE COMÚN	NOMBRE QUÍMICO	IC ₅₀ <i>in vitro</i>	BLANCO	ORDEN DE POTENCIA
Acido okadaico	9,10-Dipitio-9,10-didehidroacantifolicina	10-15 nM 0.1 nM	PP1 PP2A	PP2A > PP1 >>> PP2B
Tautomicina	Policétido	1.0 nM 10 nM	PP1 PP2A	PP1 > PP2A >>> PP2B
Cipermetrina	[(R,S)- α -Ciano-3-fenoxibencil-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato]	40 pM	PP2B	PP2B
Caliculina A	Ácido graso octametilpolihidroxilado	2.0 nM 0.5-1 nM	PP1 PP2A	PP2A~PP1 >>> PP2B
Cantaridina	Hexahidro-3a,7a-dimetil-4,7-epoxibenceno-furan-1,3-diona	40 nM 473 nM	PP2A PP1	PP2A>PP1 >>> PP2B
Fenvalerato	α -Ciano-3-fenoxibencil- α (4-clorofenil) isovalonato	2-4 nM	PP2B	PP2B
Deltametrina	[(S)- α -Ciano-3-fenoxibencil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil-ciclopropano carboxilato	100 pM	PP2B	PP2B

tautomocina que proviene de la bacteria *Streptomyces spp* (6) (Fig.1B y Tabla III). Todos los compuestos anteriores, además de ser inhibidores reversibles son inhibidores competitivos, inhiben a las enzimas de la familia PPP por su unión a un grupo de aminoácidos localizados fuera del sitio catalítico en la subunidad catalítica de las fosfatasa, estos inhibidores se unen al mismo sitio sobre las enzimas, pero con diferentes potencias.

La dosis efectiva 50 (IC₅₀) del inhibidor está determinada en ensayos *in vitro* con la enzima purificada. Es muy común que a concentraciones relativamente altas de un inhibidor selectivo para una fosfatasa se abata la actividad de otras fosfatasas, incluso de distintas clases. Por ejemplo, 0.1 nM de ácido okadaico inhibe a la PP2A, pero 10-15 nM inhibe también a la PP1 aunque no a la PP2B, compuestos relacionados con la apomorfina inhiben principalmente a las PTPs, pero también a la PP2A (Tabla I) (6).

INHIBIDORES SINTÉTICOS

La síntesis de inhibidores peptídicos y no-peptídicos de las fosfatasas es realizada por la industria farmacéutica. Muchas veces, estos inhibidores se sintetizan con base a la estructura de la proteína sustrato de la enzima y otras con base en el mecanismo de reacción del ciclo catalítico. Existe un mayor número de inhibidores sintéticos para las PTPs con respecto a las PPs. Así por ejemplo, un buen inhibidor peptídico de las PTPs contiene fosfotirosina porque corresponde al sitio natural de fosforilación, en algunos casos la fosfotirosina es sustituida por tiofosfato, un grupo no hidrolizable. Igualmente para este caso, ha sido importante considerar en el diseño de estas moléculas a los aminoácidos que rodean a la fosfotirosina ya que son importantes para la catalálisis. Se demostró que se requiere un mínimo de seis aminoácidos para ésta sea eficiente, y que uno solo puede ser crítico para la actividad, como sucede para la PTP de *Yersinia*, ya que la sustitución secuencial de cada aminoácido de un péptido específico permitió detectar que al reemplazar el ácido glutámico localizado hacia el extremo amino de la fosfotirosina por la alanina reduce hasta 130 veces la afinidad de la enzima por su sustrato.

Por otra parte, dada la susceptibilidad de los inhibidores peptídicos a la proteólisis, se han desarrollado recientemente inhibidores no-peptídicos, especialmente para utilizarse como drogas en la práctica médica. El grupo químico más empleado en el diseño de estos inhibidores es el difluorofosfonato porque mimetiza que la fosfotirosina se une con alta afinidad a la PTP.

II. PROTEÍNA CINASA C (PKC)

La contraparte de la actividad de las fosfatasas en la fosforilación de proteínas es la actividad de las cinasas. A continuación describiré las características generales de la estructura y la función de estas proteínas, específicamente de la proteína cinasa C (PKC).

tautomocina que proviene de la bacteria *Streptomyces spp* (6) (Fig.1B y Tabla III). Todos los compuestos anteriores, además de ser inhibidores reversibles son inhibidores competitivos, inhiben a las enzimas de la familia PPP por su unión a un grupo de aminoácidos localizados fuera del sitio catalítico en la subunidad catalítica de las fosfatasa, estos inhibidores se unen al mismo sitio sobre las enzimas, pero con diferentes potencias.

La dosis efectiva 50 (IC₅₀) del inhibidor está determinada en ensayos *in vitro* con la enzima purificada. Es muy común que a concentraciones relativamente altas de un inhibidor selectivo para una fosfatasa se abata la actividad de otras fosfatasas, incluso de distintas clases. Por ejemplo, 0.1 nM de ácido okadaico inhibe a la PP2A, pero 10-15 nM inhibe también a la PP1 aunque no a la PP2B, compuestos relacionados con la apomorfina inhiben principalmente a las PTPs, pero también a la PP2A (Tabla I) (6).

INHIBIDORES SINTÉTICOS

La síntesis de inhibidores peptídicos y no-peptídicos de las fosfatasas es realizada por la industria farmacéutica. Muchas veces, estos inhibidores se sintetizan con base a la estructura de la proteína sustrato de la enzima y otras con base en el mecanismo de reacción del ciclo catalítico. Existe un mayor número de inhibidores sintéticos para las PTPs con respecto a las PPs. Así por ejemplo, un buen inhibidor peptídico de las PTPs contiene fosfotirosina porque corresponde al sitio natural de fosforilación, en algunos casos la fosfotirosina es sustituida por tiofosfato, un grupo no hidrolizable. Igualmente para este caso, ha sido importante considerar en el diseño de estas moléculas a los aminoácidos que rodean a la fosfotirosina ya que son importantes para la catalálisis. Se demostró que se requiere un mínimo de seis aminoácidos para ésta sea eficiente, y que uno solo puede ser crítico para la actividad, como sucede para la PTP de *Yersinia*, ya que la sustitución secuencial de cada aminoácido de un péptido específico permitió detectar que al reemplazar el ácido glutámico localizado hacia el extremo amino de la fosfotirosina por la alanina reduce hasta 130 veces la afinidad de la enzima por su sustrato.

Por otra parte, dada la susceptibilidad de los inhibidores peptídicos a la proteólisis, se han desarrollado recientemente inhibidores no-peptídicos, especialmente para utilizarse como drogas en la práctica médica. El grupo químico más empleado en el diseño de estos inhibidores es el difluorofosfonato porque mimetiza que la fosfotirosina se une con alta afinidad a la PTP.

II. PROTEÍNA CINASA C (PKC)

La contraparte de la actividad de las fosfatasas en la fosforilación de proteínas es la actividad de las cinasas. A continuación describiré las características generales de la estructura y la función de estas proteínas, específicamente de la proteína cinasa C (PKC).

Ila. CLASIFICACIÓN DE LA PKC

La familia de la PKC consta de varias isoformas; al menos 11 son productos de genes distintos, y una es resultado de la edición alternativa de uno de los genes, por lo que la regulación de esta cinasa es muy compleja (18).

A la familia de la PKC se le agrupa en tres categorías por sus requerimientos de cofactores: *formas convencionales* (α , β I, β II, y γ) que requieren de fosfatidilserina, calcio y 1,2-diacilglicerol (DAG) por lo que además son activadas farmacológicamente por ésteres de forbol como el PMA (del inglés: Phorbol-13-Mirystate-12-Acetate), las *formas no convencionales* (ϵ , η , δ , μ y θ) con requerimientos similares a las anteriores, pero independientes de calcio, y las *formas atípicas* (ζ , τ y λ) que no requieren ninguno de los cofactores mencionados (18 y 19).

Iib. ESTRUCTURA DE LA PKC

Las distintas isoformas de la PKC están constituidas por un solo polipéptido formado por un extremo amino terminal regulador de aproximadamente 20 a 40 kDa y un extremo carboxilo terminal catalítico de 45 kDa. Tienen cuatro regiones con alta homología, los dominios C1 a C4 y cinco regiones variables, de V1 a V5, intercaladas entre las regiones C o constantes (Fig.2) (18 y 19).

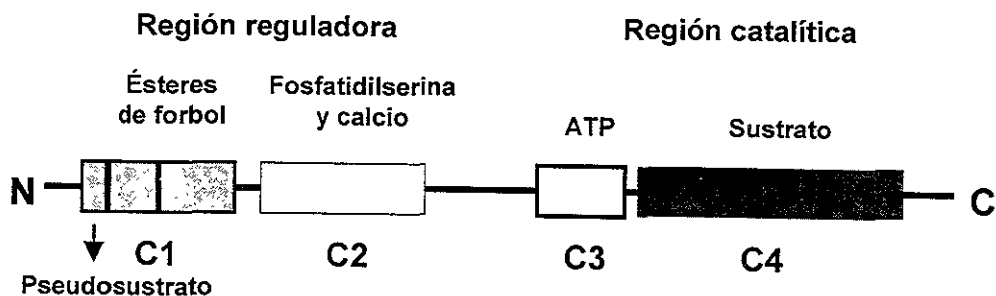
El dominio C1 es una región rica en residuos de cisteína; las isoformas que responden a PMA tienen dos, y otras como la PKC ζ sólo tiene uno por lo que no es activada por estos agentes (19). C1 constituye el sitio de unión del DAG y de los ésteres de forbol, compuestos que se emplean como activadores farmacológicos de la PKC ya que mimetizan la acción del DAG sobre la proteína. Además, el dominio C1 se considera el sitio de unión de la cinasa a la membrana plasmática (19).

El dominio C2 contiene el sitio de reconocimiento para fosfolípidos ácidos y el sitio de unión al ión calcio. Se considera que C2 es la región que permite la interacción física de PKC con otras proteínas, ya que se trata del sitio de interacción con los RACKs (del inglés: Receptors for Activated PKCs).

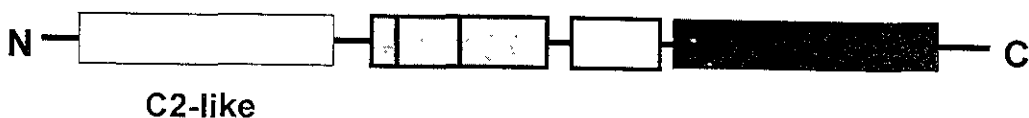
Los dominios C3 y C4 se conservan en todas las PKCs de todas las especies (18 y 19); C3 tiene la secuencia de cinasa o sitio catalítico de unión al ATP y C4 es la región de reconocimiento del sustrato (19).

La PKC tienen dominios PH (del inglés: Pleckstrin Homology domain) que determinan su localización subcelular y el anclaje a la membrana plasmática. Se ha encontrado que algunos sustratos de la cinasa y los RACKs tienen el dominio PH, considerado entre otros como un dominio de interacción proteína-proteína (19).

PKCs convencionales: α , β I, β II y γ



PKCs no-convencionales: δ , ϵ , η , y θ



PKCs atípicas: ζ , τ y λ



Fig.2. Estructura de las isoformas convencionales, no-convencionales y atípicas de la proteína cinasa C (PKC). Dominios conservados: C1 de unión al 1,2-diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol; C2 de unión del calcio y de la fosfatidilserina; C3 de unión del ATP y C4 de unión al sustrato. C2-like; región similar al dominio C2 de las formas de PKC convencionales, N; extremo amino de la proteína, C; extremo carboxilo de la proteína.

IIC. MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN DE LA PKC

La función de la PKC está bajo el control de tres mecanismos, la fosforilación, la autoinhibición reversible por el pseudosustrato y la inhibición (20).

i) REGULACIÓN DE LA PKC POR EL PSEUDOSUSTRATO

La secuencia autoinhibidora de las PKCs convencionales conocida como pseudosustrato precede inmediatamente al dominio C1 en el extremo amino de la proteína (Fig.2). Por estudios bioquímicos se ha sugerido que el pseudosustrato es una región protegida de la proteólisis cuando la enzima está inactiva, pero cuando se activa por fosfatidilserina, calcio, DAG y/o ésteres de forbol, ésta es fácilmente degradada por la tripsina y por la endoproteinasa Arg-C.

Cuando la enzima madura (fosforilada) se encuentra en el citosol tiene una conformación inactiva proporcionada por la secuencia autoinhibidora del pseudosustrato que ocupa el sitio activo. En presencia del ligando (DAG, fosfolípidos, calcio y/o ésteres de forbol) la enzima madura se transloca a la membrana plasmática donde cambia de conformación lo que permite que el pseudosustrato sea removido del sitio activo, así la PKC libre de un impedimento estérico es capaz de fosforilar al sustrato. Si la enzima tiene la conformación desfosforilada el pseudosustrato no ocupa el sitio activo, sin embargo esta conformación es muy importante para que la PDK1 tenga acceso al sitio de fosforilación sobre la PKC e inicie su maduración.

Se concluye que el pseudosustrato juega dos papeles en la regulación de la PKC, modula la fosforilación de la enzima precursora y regula la actividad de la enzima madura (20).

ii) FOSFORILACIÓN

En general, las PKCs tiene varios sitios probables de fosforilación, residuos de serina, treonina y tirosina, uno muy importante porque modula positivamente su actividad es el sitio fosforilado por la cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PKD1), la treonina 500 que se localiza en el dominio de cinasa o dominio de activación. Algunos estudios indican que las isoformas α , β I y β II de PKC son sintetizadas como precursores inactivos y que se requiere de la fosforilación para que se activen, al parecer cada fosforilación tiene un significado funcional.

La PKC β II se fosforila *in vivo* en tres sitios, las treoninas 500 y 641 y la serina 600. El análisis bioquímico y estructural de la PKC β II indica que la fosforilación de la treonina 500 permite que los residuos de aminoácidos que participan en la catálisis se encuentren en la posición correcta y "dispara" la autofosforilación de la treonina 641 y la serina 660 en el extremo carboxilo. La autofosforilación de la serina 660 se asocia con la liberación de la PKC en el citosol.

Por otra parte, la desfosforilación diferencial de la treonina 500 y la serina 660 por la PP2A y de los tres sitios por la PP1, sugiere que todos los sitios de fosforilación de la PKC son importantes para su función y para su localización subcelular (21).

iii) INHIBICION DE LA PKC

Dilucidar el papel de las distintas isoformas de la PKC ha sido posible gracias al empleo de agentes que inhiben su actividad. No obstante, son muy pocos los agentes farmacológicos que muestran una selectividad buena, o que pueden ser utilizados *in vivo* ya que la mayoría de los compuestos diseñados actúan sobre otras cinasas o sobre varias isoformas de la misma familia, y otros son impermeables a la célula intacta (6 y 28).

INHIBIDORES NATURALES Y SINTÉTICOS

Los inhibidores de PKC se clasifican, de acuerdo al sitio de interacción dentro de la estructura de la proteína, en reversibles y no-competitivos o en reversibles y competitivos. Los primeros son moléculas que se unen al dominio regulador ya sea en el sitio blanco de unión de fosfolípidos o en el sitio blanco de los ésteres de forbol, mientras que los otros son moléculas que se unen en el dominio catalítico, directamente en el sitio de unión del ATP.

Estos inhibidores tienen selectividad por PKC o por isoformas individuales, pero también por otras cinasas. La estaurosporina, un alcaloide microbiano identificado hace 20 años como un potente inhibidor de la PKC, compete por el sitio de unión del ATP y puede inhibir potencialmente tanto, cinasas de residuos de serina y/o treonina como cinasas de tirosina y no presenta especificidad por isoformas de la PKC (Tabla IV). Sin embargo, la estaurosporina se trata de un compuesto básico cuya fórmula química se ha utilizado para el diseño de muchos nuevos inhibidores sintéticos, tales como el indolocarboxol y la bisindolmaleimida (Tabla IV). Inhibidores de este último grupo como el Ro 318220, el cual tiene un grupo alquilo con un sustituyente catiónico, produce una inhibición similar de las isoformas β , γ y ϵ de la PKC (Tabla IV) (28).

Igual que en el caso de las cinasas de residuos de serina/treonina, los productos naturales son fuente de inhibidores de cinasas de residuos de tirosina, un ejemplo es la genisteína, un inhibidor competitivo producido por cepas de *Pseudomonas* (Tabla IV).

INHIBICIÓN DE PKC POR SECUENCIAS ANTISENTIDO DEL RNA mensajero (RNAm)

La especificidad de los oligonucleótidos (secuencias antisentido de un gene que bloquean la expresión del RNAm blanco) ha permitido que sean considerados inhibidores específicos de las isoformas de PKC, además de que se

Tabla IV.

Inhibidores específicos de cinasas de residuos de serina/treonina, de cinasas de residuos de tirosina y de la cinasa de la posición 3 del anillo de inositol (PI-3K).

NOMBRE COMÚN	NOMBRE QUÍMICO	IC ₅₀ o Ki	BLANCO	ORDEN DE POTENCIA
Ro-318220	{3-[1-[3-(Amidinotio) propil-1H-indol-3il]-3-(1-metil-1H-indol-3-il)-maleimida metano sulfonato}	10 nM 17 μM 900 nM	PKC CaMK PKA	PKC > PKA > CaMK
Estaurosporina	1H-indol[2,3-a]pirrol [3,4-c] carboxol	0.7 nM 7.0 nM 20 nM 8.5 nM	PKC PKA CaMK PKG	PKC > PKG ~ PKA > CaMK
Genisteína	4',5,7-Trihidroxiisoflavona	2.6 μM	R-EGF y otras cinasas de tirosina	R-EGF >>> otras cinasas
Bisindolilmaleimida	2-[1,(3-dimetilamino-propil)-1H-indol-3il]-3(1H-indol-3-il) maleimida	100 nM	PKC	PKC
Wortmanina	{1S-(1α,6bα,9aβ,11α,11bβ)}-11(Acetoxi)-1,6b7,8,9a,10,11,11b-octahidro-1-(metoximetil)9a,11b-dimetil-3H-furo-[4,3,de]indeno-4,5-h]-2 benzopirano-3,6,a-triona	3.0 nM 200-300 nM	PI-3K MAPK y MLK	PI-3K >> MAPK~ MLK

PKA; proteína cinasa dependiente de AMPc, CaMK; cinasa II de la proteína dependiente de calcio-calmodulina, R-EGF; receptor del factor de crecimiento epidérmico, MLK; cinasa de la cadena ligera de la miosina, MAPK; proteína cinasa activada por mitógenos.

reconozcan como compuestos terapéuticos utilizados en padecimientos que dependen de la actividad de estas enzimas ya que presentan poco o ningún efecto inespecífico (29).

Algunos estudios realizados en carcinomas de pulmón y de vejiga revelan que el oligonucleótido antisentido fosforotioato llamado ISI3521 o CGPG4128A que hibrida con la secuencia 3' no traducida del RNAm de la PKC α de humano, reduce la expresión de PKC α con IC₅₀ de 100 nM. El mismo oligonucleótido, solo o en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar, es capaz de inhibir el crecimiento de una gran variedad de líneas celulares tumorales, lo que indica su alto potencial terapéutico (29).

ACTIVADORES NATURALES DE LA PKC

A diferencia de lo que sucede con las fosfatasa, para el estudio de la función de las cinasas sí existen compuestos que se comportan como activadores. La clase principal de activadores de la PKC consta de moléculas conocidas como ésteres de forbol (20). El PMA, un diterpeno que se extrae de las semillas del árbol *Croton tiglium* tiene una región en su estructura similar al DAG, ambos aumentan la afinidad de la PKC por calcio. El PMA y sus derivados tampoco muestran selectividad por isoformas, pero otros productos naturales se emplean con este fin, como la timeleatoxina aislada de *Thymelea hirsuta* que activa *in vivo* a PKC α , β y γ a una concentración de 1000 ng/ml. La sapintoxina A derivada de *Sapium indicum* activa a todas las isoformas, excepto a la PKC δ . Sapintoxina D, mezereína, indolactam V y resiniferatoxina activan preferencialmente a la PKC α . De estos compuestos todavía no se conoce el mecanismo de acción, pero al parecer no compiten por el sitio de unión de los ésteres de forbol (29).

Otros compuestos de origen natural, pero estructuralmente distintos a los diterpenos también activan a la PKC, por ejemplo algunos indol-alcaloides (teleocidina) o poliacetatos (aplisiatoxina) (30). Algunos sustratos también actúan como reguladores positivos de la PKC al tratarse de proteínas ricas en residuos de arginina, propiedad que las hace capaces de desplazar al pseudosustrato del sitio activo de la enzima (20).

Los estudios de especificidad de los activadores de PKC han demostrado que la proteína es muy afin por el esqueleto de glicerol y por las mitades hidrofílicas de los diglicéridos (30).

IIId. FUNCIÓN DE LA PKC EN LA CÉLULA

La PKC es una enzima citoplásmica que fosforila residuos de serina y treonina de sustratos que participan en un gran número de fenómenos celulares; contracción, proliferación, diferenciación, respuestas del sistema inmune, proceso inflamatorio, activación de plaquetas, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos (21). También participa en fenómenos como la desensibilización o pérdida de la respuesta de receptores, modulación de la estructura de la

membrana, regulación de la transcripción o en procesos que terminan en el aprendizaje y la memoria (22).

Más recientemente se ha definido la participación de las distintas isoformas de PKC en procesos celulares específicos, por ejemplo, en neutrófilos la PKC δ fosforila al receptor p60 del factor de necrosis tumoral en respuesta al ligando del receptor (TNF α), fosforilación específicamente en residuos de serina que se asocia con su desensibilización (23). PKC ϵ participa en la activación de linfocitos T (24). PKC α , δ y θ se requieren para inhibir la activación de la cinasa de tirosina del receptor de insulina (25). PKC ϵ se requiere para activar la vía de la MAPK (ERK1/2) (26). La fosforilación por PKC α estimula la actividad de la cinasa AKT y evita la apoptosis (27), etcétera.

III. DESENSIBILIZACIÓN DE RECEPTORES

Uno de los fenómenos celulares que regulan la transducción de señales, en especial la de los receptores acoplados a proteínas G, es la **desensibilización**, término que se aplica a la disminución o pérdida total de la respuesta como efecto de la exposición prolongada de la célula a un estímulo.

Desde el punto de vista operativo se denomina **desensibilización homóloga** a la que inducen agonistas sobre su propio receptor. Se denomina **desensibilización heteróloga** a aquella inducida por otro tipo de agente.

Desde el punto de vista molecular sabemos, en general, que en el primer tipo de desensibilización, el receptor en respuesta a la unión del ligando activa a la proteína G heterotrimérica que libera a las subunidades $\beta\gamma$, las cuales asociadas a la membrana plasmática junto con fosfatidilinositol funcionan como acarreadores de las cinasas específicas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) al unirse a su extremo carboxilo. La cercanía de la GRK con el receptor permite su fosforilación, modificación que lo hace más afin por la proteína llamada arrestina. La nueva localización de la arrestina interfiere con la interacción que existe normalmente, entre el receptor y la proteína G, y además, estabiliza el estado desacoplado del receptor, por lo que no hay transmisión de la señal. La arrestina, junto con otras proteínas, tales como la clatrina y la dinamina (enzima que hidroliza GTP) inician la internalización de los receptores fosforilados en vesículas (31) (Fig. 3).

En el segundo tipo de desensibilización, el receptor activado por su ligando estimula a la proteína G, y esta a su vez, a la proteína efectora ya sea la fosfolipasa C (PLC) o la adenilato ciclasa (AC) por ejemplo. Estos efectores a través de DAG y AMP cíclico activan cinasas moduladas por segundos mensajeros, la PKC y la PKA que al fosforilar distintas clases de receptores provocan la pérdida de respuesta a un estímulo susecuente (Fig.3). Algunas evidencias sugieren que en este tipo de desensibilización también participan cinasas de residuos de tirosina (31).

membrana, regulación de la transcripción o en procesos que terminan en el aprendizaje y la memoria (22).

Más recientemente se ha definido la participación de las distintas isoformas de PKC en procesos celulares específicos, por ejemplo, en neutrófilos la PKC δ fosforila al receptor p60 del factor de necrosis tumoral en respuesta al ligando del receptor (TNF α), fosforilación específicamente en residuos de serina que se asocia con su desensibilización (23). PKC ϵ participa en la activación de linfocitos T (24). PKC α , δ y θ se requieren para inhibir la activación de la cinasa de tirosina del receptor de insulina (25). PKC ϵ se requiere para activar la vía de la MAPK (ERK1/2) (26). La fosforilación por PKC α estimula la actividad de la cinasa AKT y evita la apoptosis (27), etcétera.

III. DESENSIBILIZACIÓN DE RECEPTORES

Uno de los fenómenos celulares que regulan la transducción de señales, en especial la de los receptores acoplados a proteínas G, es la **desensibilización**, término que se aplica a la disminución o pérdida total de la respuesta como efecto de la exposición prolongada de la célula a un estímulo.

Desde el punto de vista operativo se denomina **desensibilización homóloga** a la que inducen agonistas sobre su propio receptor. Se denomina **desensibilización heteróloga** a aquella inducida por otro tipo de agente.

Desde el punto de vista molecular sabemos, en general, que en el primer tipo de desensibilización, el receptor en respuesta a la unión del ligando activa a la proteína G heterotrimérica que libera a las subunidades $\beta\gamma$, las cuales asociadas a la membrana plasmática junto con fosfatidilinositol funcionan como acarreadores de las cinasas específicas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) al unirse a su extremo carboxilo. La cercanía de la GRK con el receptor permite su fosforilación, modificación que lo hace más afín por la proteína llamada arrestina. La nueva localización de la arrestina interfiere con la interacción que existe normalmente, entre el receptor y la proteína G, y además, estabiliza el estado desacoplado del receptor, por lo que no hay transmisión de la señal. La arrestina, junto con otras proteínas, tales como la clatrina y la dinamina (enzima que hidroliza GTP) inician la internalización de los receptores fosforilados en vesículas (31) (Fig 3).

En el segundo tipo de desensibilización, el receptor activado por su ligando estimula a la proteína G, y esta a su vez, a la proteína efectora ya sea la fosfolipasa C (PLC) o la adenilato ciclasa (AC) por ejemplo. Estos efectores a través de DAG y AMP cíclico activan cinasas moduladas por segundos mensajeros, la PKC y la PKA que al fosforilar distintas clases de receptores provocan la pérdida de respuesta a un estímulo sucesivo (Fig.3). Algunas evidencias sugieren que en este tipo de desensibilización también participan cinasas de residuos de tirosina (31).

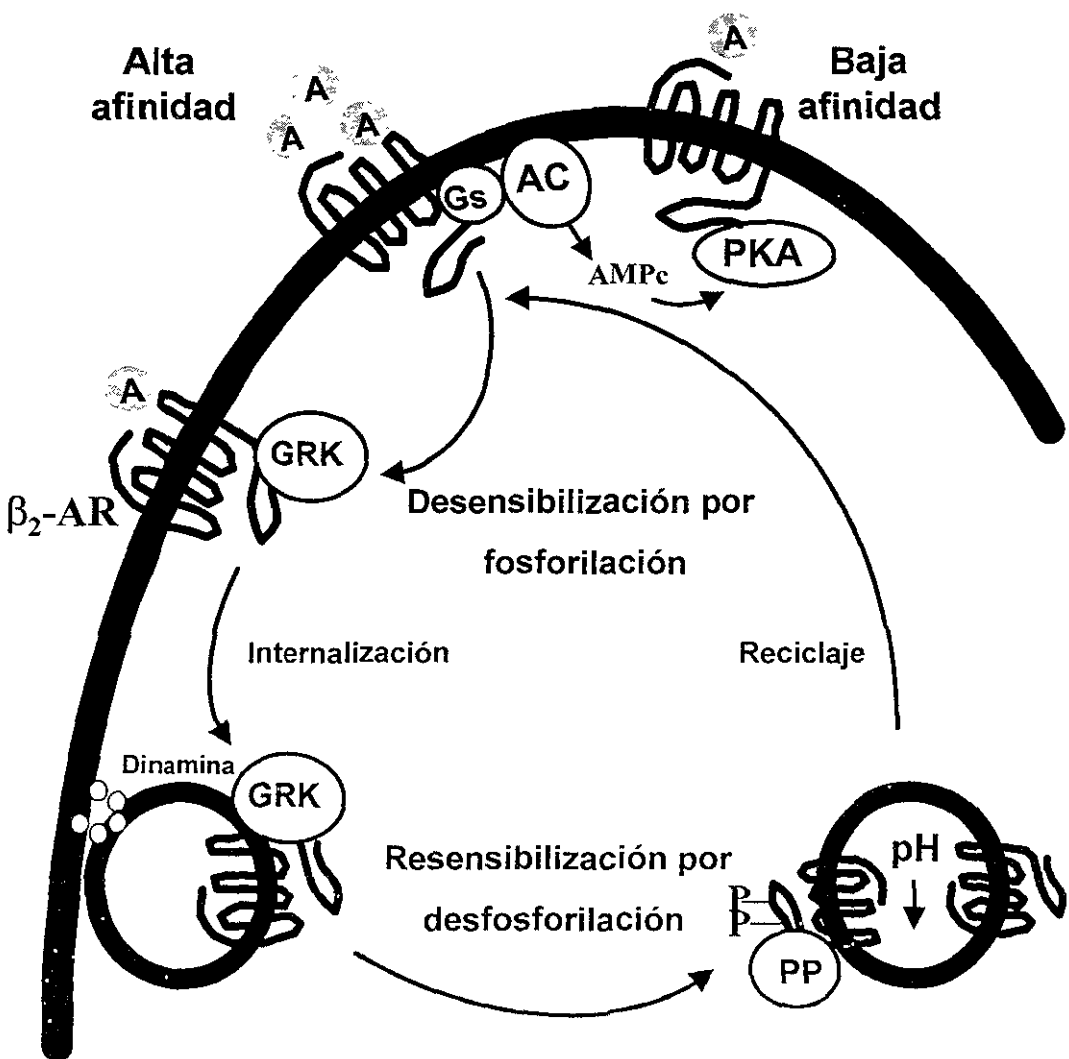


Fig.3. Mecanismo de desensibilización y resensibilización del receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR). El β_2 -AR al ser activado por su agonista (A) adquiere un estado de alta afinidad, se acopla a la proteína Gs y a la adenilato ciclasa (AC) para generar AMP cíclico (AMPc) que activa a la PKA, cinasa que fosforila al β_2 -A y baja su afinidad. Por otra parte, el β_2 -AR en respuesta al agonista es fosforilado por una cinasa específica (GRK) y se internaliza en vesículas de clatrina que se desprenden de la membrana plasmática por efecto de la dinamina. Una disminución en el pH interno de las vesículas ocasiona un cambio conformacional del β_2 -AR que permite la interacción de una fosfatasa (PP) que lo desfosforila para que regrese nuevamente a la superficie de la célula.

Si bien, la desensibilización se asocia principalmente con la fosforilación del receptor, igualmente se ha observado que la disminución en la respuesta es consecuencia de la internalización y/o de la degradación o inhibición de la expresión del receptor. A veces, la desensibilización es consecuencia de dos o más eventos (31, 32 y 33).

Un estudio realizado también con el β_2 -AR muestra que la recuperación de la respuesta o **resensibilización**, se relaciona con la desfosforilación del receptor. En ella participan fosfatasas clase 1, 2A y 2B. Una disminución del pH interno de las vesículas, induce un cambio conformacional de los receptores fosforilados, que permite la asociación de fosfatasas vesiculares, y posteriormente el reciclaje de los receptores, nuevamente a la membrana plasmática (34).

i) FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR

Algunos receptores acoplados a proteínas G se desensibilizan por fosforilación. Los receptores β_2 -adrenérgicos, receptores de lutropina, receptores α_1 -adrenérgicos y receptores muscarínicos (35, 36, 37 y 38) son fosforilados por cinasas de tres tipos: PKC y PKA, reguladas por segundos mensajeros; por GRKs, específicas de receptores de siete dominios transmembranales y por receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina (39). El equilibrio del estado de fosforilación de los receptores membranales es muy importante, ya que como mencioné anteriormente, su resensibilización requiere de la desfosforilación (40).

ii) DESACOPLAMIENTO ENTRE EL RECEPTOR Y LA PROTEÍNA G

Las proteínas G, llamadas así porque unen nucleótidos de guanina, están conformadas por tres subunidades conocidas como α , β y γ , de las cuales se conocen 20, 5 y 12 entidades moleculares, respectivamente. Estas proteínas con actividad de GTPasa son elementos indispensables en la transducción de señales, ya que tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ tienen numerosos efectores intracelulares (41).

En algunos casos, la desensibilización es independiente de la fosforilación del receptor, como sucede en el sistema del receptor para la hormona paratiroidea. No obstante que el receptor es fosforilado por la GRK2 después de la unión del ligando, dicha modificación no da lugar a la pérdida de la respuesta. En este sistema transduccional, la desensibilización es consecuencia de la interacción directa del receptor y la GRK2, interacción que bloquea la transmisión de la señal, como resultado de una disminución de la actividad de GTPasa de la proteína G (42).

En otros sistemas algunas proteínas como la fosducina o la calmodulina, funcionan como trampas de los dímeros $\beta\gamma$, regulando indirectamente la interacción entre la proteína G y el receptor y por tanto la desensibilización. Lo que sucede es que al no encontrarse dímeros $\beta\gamma$ disponibles para asociarse con las subunidades α no se forman proteínas G heterotriméricas susceptibles de la activación por receptores (43)

Otros moduladores de la transducción de señales son las proteínas llamadas RGS (Regulators of G-protein Signalling) que catalizan el recambio de GTP de la proteína Go. Estos RGS pueden regular respuestas que se observan a tiempos cortos o respuestas a tiempos largos. En el primer caso, los RGS expresados constitutivamente en las células modulan el apagado rápido de la señal mediada por las proteínas *Gi/o* y transducina. En la adaptación de las células como mecanismo de desensibilización/resensibilización, la sobreexpresión de estas proteínas específicas, la cual es modulada en ocasiones por segundos mensajeros como el calcio y el AMP cíclico, funciona como un mecanismo de retroalimentación negativa de la transducción, pero que requiere de más tiempo porque implica la transcripción y la traducción de la proteína (44).

IV. COMPLEJOS MULTIPROTÉICOS

La formación de módulos integrados por la proteína sustrato, cinasas y fosfatasa, además de otros reguladores de la función del sistema transduccional puede explicar, en parte, la fina y rápida regulación de la transmisión de la señal mediada por la fosforilación de proteínas.

El descubrimiento de numerosas proteínas andamio, de anclaje o adaptadoras para otras proteínas, ha revolucionado la idea de que una vía de transducción consta de proteínas aisladas, localizadas en el citosol de la célula y que participan solamente cuando son activadas por un segundo mensajero que ha logrado difundir hasta donde ésta se encuentra.

Las proteínas adaptadoras permiten, por una parte, la localización específica en la célula de las proteínas que participan en la vía de transducción pero además, permiten la asociación directa de otros elementos reguladores. Estas proteínas funcionan como multicontactos ya que cuentan con varios dominios en sus secuencias primarias, considerados como sitios de interacción proteína-proteína. Es el caso de los dominios: PDZ (Post-synaptic density protein-95, Dlg, ZO-1), SH2, SH3 (Src Homology 2 and 3), DD (Death Domain), ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) o el dominio SAM (Sterile Alpha Motif) de proteínas involucradas en el desarrollo de *Drosophila* y en la diferenciación sexual de algunas levaduras, entre otros (45).

El receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) tiene una región intracelular con varios dominios de unión para proteínas citoplásmicas, una región transmembranal y un dominio catalítico intracelular. Estos receptores son el prototipo de los sistemas transduccionales que amplifican la señal a través de la interacción física del receptor con numerosas proteínas (46). La transducción de la señal consiste en la autofosforilación del PDGF-R en residuos de tirosina y su dimerización cuando éste ha sido activado por el mensajero primario. Las fosforilaciones en residuos de tirosina permiten la interacción del receptor con un número grande de enzimas tales como la fosfolipasa $C\gamma$, la subunidad de 85 kDa de la PI-3K, la proteína activadora de GTPasa (GAP), la proteína 2 de unión al receptor (Grb2), la fosfatasa de residuos de tirosina (SHPTP-2) y varios miembros de la familia de cinasas de tirosina (Src)

Otros moduladores de la transducción de señales son las proteínas llamadas RGS (Regulators of G-protein Signalling) que catalizan el recambio de GTP de la proteína Go. Estos RGS pueden regular respuestas que se observan a tiempos cortos o respuestas a tiempos largos. En el primer caso, los RGS expresados constitutivamente en las células modulan el apagado rápido de la señal mediada por las proteínas Gi/o y transducina. En la adaptación de las células como mecanismo de desensibilización/resensibilización, la sobreexpresión de estas proteínas específicas, la cual es modulada en ocasiones por segundos mensajeros como el calcio y el AMP cíclico, funciona como un mecanismo de retroalimentación negativa de la transducción, pero que requiere de más tiempo porque implica la transcripción y la traducción de la proteína (44).

IV. COMPLEJOS MULTIPROTÉICOS

La formación de módulos integrados por la proteína sustrato, cinasas y fosfatasa, además de otros reguladores de la función del sistema transduccional puede explicar, en parte, la fina y rápida regulación de la transmisión de la señal mediada por la fosforilación de proteínas.

El descubrimiento de numerosas proteínas andamio, de anclaje o adaptadoras para otras proteínas, ha revolucionado la idea de que una vía de transducción consta de proteínas aisladas, localizadas en el citosol de la célula y que participan solamente cuando son activadas por un segundo mensajero que ha logrado difundir hasta donde ésta se encuentra.

Las proteínas adaptadoras permiten, por una parte, la localización específica en la célula de las proteínas que participan en la vía de transducción pero además, permiten la asociación directa de otros elementos reguladores. Estas proteínas funcionan como multicontactos ya que cuentan con varios dominios en sus secuencias primarias, considerados como sitios de interacción proteína-proteína. Es el caso de los dominios: PDZ (Post-synaptic density protein-95, Dig, ZO-1), SH2, SH3 (Src Homology 2 and 3), DD (Death Domain), ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) o el dominio SAM (Sterile Alpha Motif) de proteínas involucradas en el desarrollo de *Drosophila* y en la diferenciación sexual de algunas levaduras, entre otros (45).

El receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) tiene una región intracelular con varios dominios de unión para proteínas citoplásmicas, una región transmembranal y un dominio catalítico intracelular. Estos receptores son el prototipo de los sistemas transduccionales que amplifican la señal a través de la interacción física del receptor con numerosas proteínas (46). La transducción de la señal consiste en la autofosforilación del PDGF-R en residuos de tirosina y su dimerización cuando éste ha sido activado por el mensajero primario. Las fosforilaciones en residuos de tirosina permiten la interacción del receptor con un número grande de enzimas tales como la fosfolipasa Cy, la subunidad de 85 kDa de la PI-3K, la proteína activadora de GTPasa (GAP), la proteína 2 de unión al receptor (Grb2), la fosfatasa de residuos de tirosina (SHPTP-2) y varios miembros de la familia de cinasas de tirosina (Src)

(45). La alta afinidad de interacción receptor/proteína es el resultado de la unión de dominios de aproximadamente 100 aminoácidos conocidos como SH2 que reconocen, precisamente, a las tirosinas fosforiladas del receptor (45). Algunas interacciones entre las proteínas que conforman la vía del PDGF-R se forman entre dominios SH2 y dominios SH3, estos últimos reconocen regiones ricas en prolina (46).

Otro ejemplo claro de la modulación por medio de complejos multiprotéicos es la transmisión sináptica, mediada por los receptores canal de N-metil-D-aspartato (NMDA). La fosforilación del canal iónico por PKA amplifica las corrientes eléctricas, mientras que la desfosforilación por la PP1 las inhibe (47). Recientemente se demostró que la eficacia de la transmisión sináptica se debe al módulo formado por el receptor, la fosfatasa y la cinasa, todos unidos por "yotiao", proteína que interactúa con la región carboxilo terminal del canal ya que esta cuenta con sitios de interacción proteína-proteína (48).

La fototransducción en insectos es otro fenómeno celular en donde los módulos transduccionales son relevantes. Este proceso que comienza con la activación del receptor de siete dominios transmembranales, seguido por el acoplamiento a la proteína G, activación de la fosfolipasa C, generación de IP₃ y DAG, apertura y modulación de dos canales iónicos activados por la luz de potencial transitorio (TRP y TRP-like) y la subsecuente activación de PKC, con el propósito de desactivar la respuesta a la luz y adaptarse, ocurre en milisegundos. ¿Cómo es esto posible? INAD (Inactivation-No-Afterpotential-D), una proteína con múltiples dominios PDZ forma un transducisoma con la PKC, TRP, la calmodulina y la fosfolipasa C, manteniéndolos en gran proximidad, aislados de otras vías y promoviendo una rápida interacción entre los distintos participantes, regulando en muy poco tiempo la sensibilidad a la luz (49).

Los módulos protéicos también son importantes en la comunicación cruzada. El receptor de insulina (I-R) puede interactuar directamente con algunas isoformas de la PKC. La fosforilación del I-R en residuos de serina y treonina, al parecer, es un evento crucial para una adecuada selección intracelular del I-R hacia la vía de degradación en lisosomas (50). De la misma forma el receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α -R) puede asociarse a distintas isoformas de la PKC, la fosforilación en residuos de serina se asocia con la insensibilidad del receptor (23).

Entre las proteínas de anclaje descubiertas, sobresale la familia de las AKAPs (A-Kinase-Anchoring-Protein). A la fecha se han identificado 36 AKAPs, cada una contiene una hélice anfipática conservada responsable de su asociación a la subunidad reguladora II de la PKA y a otras proteínas (51).

Por otra parte, algunas proteínas implicadas en diversas funciones celulares como la PP2A, una enzima altamente regulada por metilación y fosforilación, es capaz de formar complejos estables con una gran cantidad de proteínas. Por ejemplo con cinasas (cinasa de la subunidad ribosomal S6, cinasa de la caseína II, Raf-1, JAK2), con proteínas virales (proteína pequeña SV40, proteína pequeña t del poliomavirus, adenovirus E4) y otras (TAU, ciclina G1, caspasa-3) (52).

V. RECEPTORES ADRENÉRGICOS

En este apartado describiré las características, vías de transducción, regulación y efectos celulares de los receptores adrenérgicos, en particular de los receptores α_{1b} -adrenérgicos (α_{1b} -AR) por tratarse del modelo de estudio del presente trabajo.

Los ligandos naturales de los receptores adrenérgicos son la adrenalina y la noradrenalina, hormona y neurotransmisor respectivamente (53). Ambos son catecolaminas, es decir aminas fenólicas dihidroxiladas, secretadas en la porción interna de la médula de la glándula adrenal en respuesta a señales del sistema nervioso central (53).

La adrenalina normalmente circula en la sangre con una concentración de 10^{-10} M, la cual en un estímulo de alarma se eleva hasta 1000 veces en segundos o minutos. Esta hormona incrementa la velocidad del latido del corazón; la presión sanguínea y causa dilatación de las vías respiratorias, que en conjunto, incrementan el O_2 liberado a los tejidos, especialmente al músculo. Tiene efectos metabólicos como el incremento en la degradación de glucógeno y la disminución de la síntesis de glucógeno, incrementa la producción de glucosa por la gluconeogénesis en el hígado, incrementa la glucólisis y la movilización de los ácidos grasos en el músculo; además, aumenta la secreción de glucagón y disminuye la secreción de insulina en el tejido adiposo. También es mediadora de la contracción, relajación, proliferación celular, por mencionar algunos (53).

A la fecha se sabe de la existencia de tres tipos de receptores adrenérgicos: β -, α_1 - y α_2 -adrenérgicos, clasificación que ha crecido gracias a los numerosos estudios farmacológicos, bioquímicos y moleculares de estos receptores. Para la *IV International Union Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors* estos receptores se dividen cada uno en tres subtipos, por lo que se conoce un total de nueve receptores adrenérgicos diferentes (54).

Va. CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS

La primera clasificación de los receptores adrenérgicos fue realizada por el grupo de Ahlquist en 1948 con base a las diferencias observadas en los efectos que generaron seis aminas simpatomiméticas en distintas preparaciones de músculo, en donde algunas de las sustancias relajaban y otras contraían el tejido, dependiendo de la concentración empleada. Se identificaron inicialmente dos tipos de receptores, los β - y los α -adrenérgicos (55).

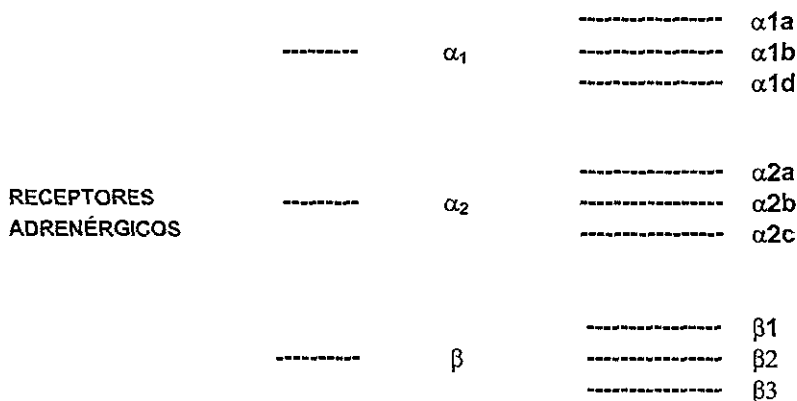
Posteriormente, en 1967 Lands y colaboradores descubrieron que existen dos clases de receptores β -adrenérgicos, el β_1 y el β_2 (56) y muchos años después se identificó un nuevo subtipo, el β_3 -adrenérgico (57).

Langer en 1977, identificó a los receptores α -adrenérgicos y los dividió en receptores presinápticos y receptores postsinápticos por su localización anatómica (58). En el mismo año, los doctores Berthelsen y Pettinger los

dividieron con base en su farmacología en los subtipos α_1 - y α_2 -adrenérgicos (59), mientras que los doctores Fain y García-Sáinz los dividieron en los mismos dos tipos de receptores, pero de acuerdo a su sistema de transducción (60).

Actualmente, tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -AR) han sido clonados: el α_{1a} -AR, el α_{1b} -AR y el α_{1d} -AR (61, 62 y 63).

El siguiente diagrama muestra la superfamilia de receptores adrenérgicos que está conformada por tres tipos de receptores, cada uno dividido en tres subtipos.



Vb. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS

La expresión de estos receptores es tejido-específico; el α_{1b} -AR por ejemplo se expresa en hígado, cerebro, corazón, riñón y pulmón de rata (64); y aunque todos se acoplan al sistema de fosfoinosítidos-calcio (FI- Ca^{2+}) por medio de proteínas G de la familia Gq (65 y 66), se les relaciona a cada uno con funciones que dependen del sistema celular. En particular, la activación del α_{1b} -AR se relaciona con la liberación de ácido araquidónico, con la transformación neoplásica y con la producción de AMPc (64). Los genes de los receptores adrenérgicos se localizan en cromosomas diferentes. La localización del α_{1a} -AR está en el 8, el α_{1b} -AR en el 5q32-q34 y el α_{1d} -AR en el cromosoma 20p13. El RNAm de cada receptor se expresa en forma paralela en los diferentes tejidos (67).

Los tres subtipos de α_1 -AR tienen un número similar de aminoácidos con pequeñas diferencias en su estructura general, el α_{1a} -AR tiene 466 aminoácidos, el α_{1b} -AR tiene 515 aminoácidos y el α_{1d} -AR tiene 560 aminoácidos.

Vc. ESTRUCTURA DE LOS α_1 -AR

El modelo de hidrofobicidad de los receptores adrenérgicos predice que son proteínas de siete dominios transmembranales I, II, III, IV, V, VI y VII formados por aminoácidos hidrofóbicos acomodados en α -hélices, unidos entre sí por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares (Fig.4).

El extremo amino de la proteína es extracelular y el extremo carboxilo es citoplásmico, ambos varían de tamaño dependiendo del subtipo de receptor (68). La segunda y tercera asas intracelulares, así como parte del carboxilo terminal, también intracelular, participan en el acoplamiento del receptor con la proteína G (69).

Los receptores adrenérgicos tienen modificaciones postraduccionales. En el extremo amino tienen enlaces N-glicosídicos con carbohidratos en residuos de arginina. El extremo carboxilo puede ser palmitoilado, lo que regula el acoplamiento del receptor con la proteína G y su unión a la membrana plasmática (67). Este extremo al igual la tercera asa pueden ser fosforilados. En particular, el α_{1b} -AR se fosforila en las serinas 404, 408 y 410 por GRK2 y GRK3 en respuesta al agonista y en las serinas 394 y 400 por la PKC (70) (Fig.4).

Vd. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE LOS α_1 -AR

i) SISTEMA DE RECAMBIO DE FOSFOINOSÍTIDOS-CALCIO (FI-calcio)

Los tres subtipos de α_1 -ARs se acoplan al sistema FI-calcio, en el cual participan las siguientes proteínas membranales: receptores, proteínas G heterotriméricas de la familia Gq y la fosfolipasa C β (FLC β) (Fig.5).

Los α_1 -ARs al ser activados por su ligando se acoplan a la proteína Gq, generando por medio de la FLC β dos segundos mensajeros: el DAG y el IP $_3$ a partir del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (IP $_2$) membranar. El DAG activa a la PKC y el IP $_3$, al difundir y unirse a su receptor tipo canal en el retículo endoplásmico permite la liberación de calcio al citoplasma, de tal manera que se eleva su concentración en el interior de la célula (71) (Fig.5). La concentración de calcio en condiciones normales se mantiene en el orden de 10^{-7} M por la acción del retículo endoplásmico, mitocondrias y membrana plasmática (72).

ii) SISTEMA DE LA PROTEÍNA CINASA ACTIVADA POR MITÓGENOS (MAPK)

Aun cuando se ha sugerido recientemente que los tres subtipos de α_1 -ARs pueden mediar funciones distintas debido a un acoplamiento a varias vías de transducción, como los α_{1a} -ARs que se sabe estimulan canales de calcio tipo-L en venas deferentes de rata y los α_{1b} -ARs que estimulan a la fosfolipasa C en bazo de rata, su papel específico todavía no es claro, por lo que probablemente a la clonación del DNA complementario (cDNA) de los tres subtipos le sigue un

Receptor α_{1b} -adrenérgico

515 aminoácidos

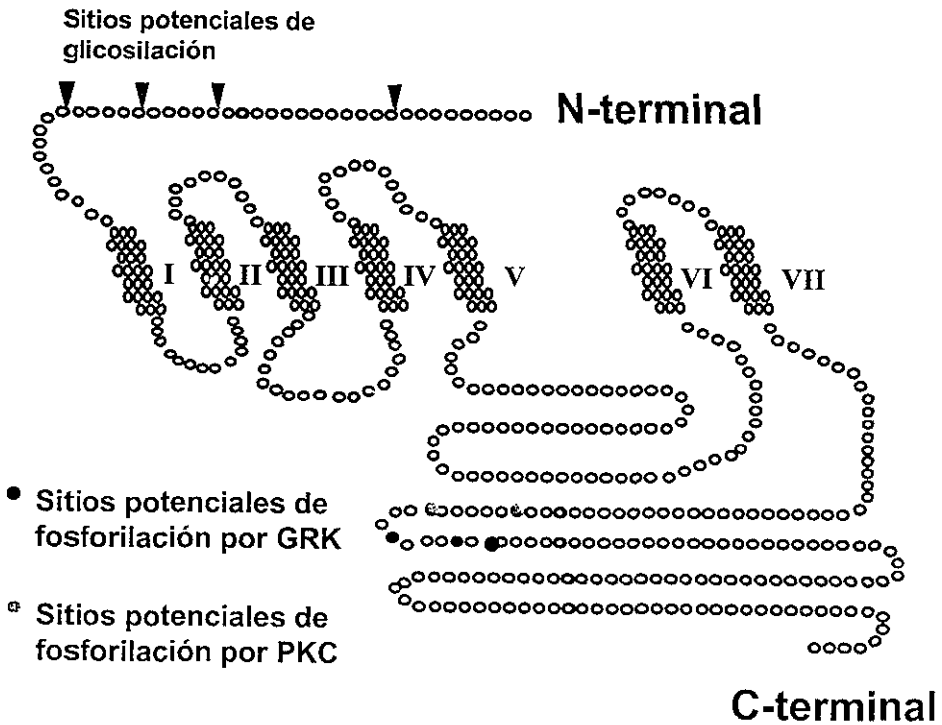


Fig.4. Estructura del receptor α_{1b} -adrenérgico (α_{1b} -AR) de hámster. El α_{1b} -AR está formado por siete regiones transmembranales (I a VII) conservadas en un 80% entre los tres subtipos de receptores, el dominio amino terminal es extracelular (N-terminal) y tiene cuatro sitios consenso de glicosilación (argininas 10, 24, 29 y 34) y un dominio carboxilo terminal que es intracelular (C-terminal) con sitios consenso de fosforilación por la PKC (serinas 394 y 400) y por la GRK (serinas 404, 408 y 410). Otros sitios probables de fosforilación se encuentran en la segunda y tercera asas intracelulares y también en el dominio C-terminal, cuyo papel no se ha determinado, así como tres residuos de tirosina en estas mismas regiones del receptor.

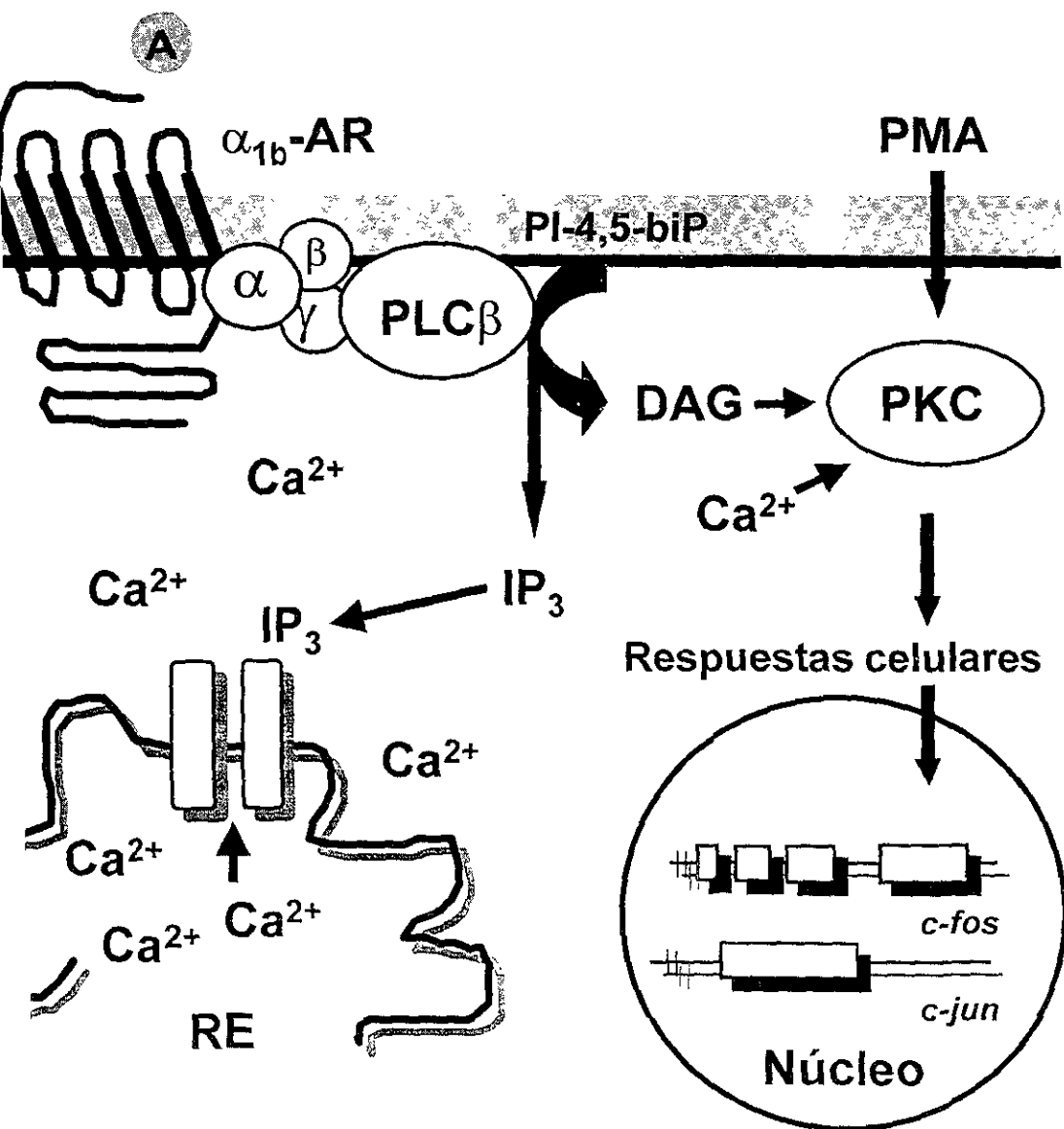


Fig. 15. Sistema de transducción del receptor α_{1b} -adrenérgico (α_{1b} -AR). La activación del receptor por su agonista (A) induce su acoplamiento con la proteína heterotrimérica Gq que activa a la fosfolipasa C β (PLC β), enzima que hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-fosfato (PI-4,5-biP) de la membrana plasmática y genera dos segundos mensajeros: 1,2-diacilglicerol (DAG) cuyo blanco es la PKC y el fosfatidilinositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃), el cual promueve la liberación de calcio (Ca²⁺) del retículo endoplásmico (RE). La PKC participa en múltiples respuestas celulares, por ejemplo, estimula la expresión de proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*. El PMA (Phorbol-Mirystate-Acetate) activa directamente a la PKC.

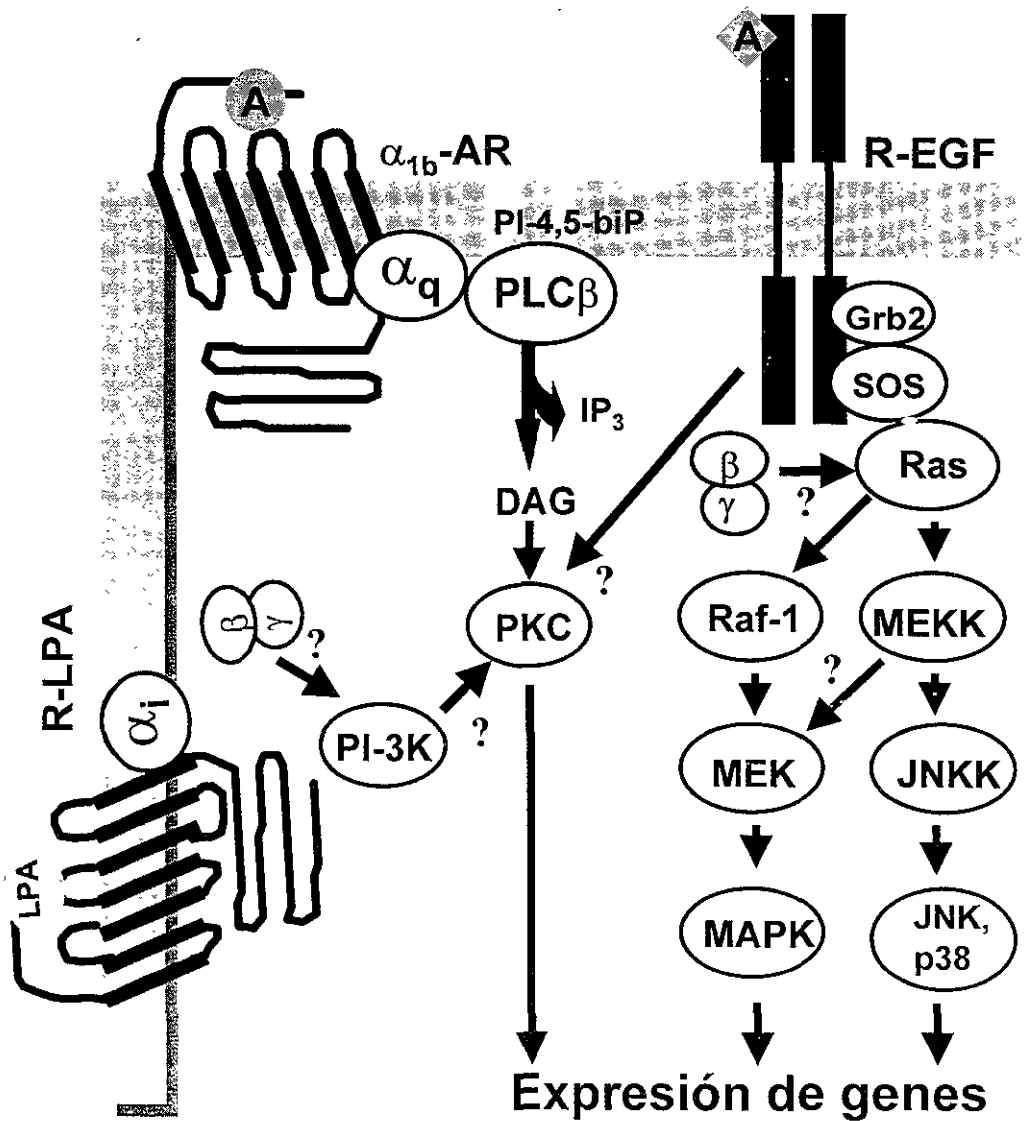
número grande de estudios comparativos de la función y expresión de cada uno con el fin de contestar esta pregunta.

Algunos estudios han demostrado que cualitativamente el α_{1a} -AR, el α_{1b} -AR y el α_{1d} -AR activan las mismas vías de transducción, además de la vía de F-calcio, como la vía de la fosfolipasa D y la vía de la MAPK o de cinasas relacionadas con ésta como p38 y JNK (cinasa del extremo amino de Jun) (Fig.6). Nosotros demostramos en fibroblastos de la línea celular Rat-1 que el orden de potencia de liberación de calcio intracelular es distinto: $\alpha_{1a} > \alpha_{1b} > \alpha_{1d}$, orden que corresponde a la activación de la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* (73). Sin embargo, también se ha observado que los subtipos α_1 -AR pueden mediar efectos opuestos. En las células COS7, mientras que el α_{1a} -AR induce una mayor liberación de calcio, en comparación con el α_{1b} - y el α_{1d} -AR, es el subtipo α_{1d} -AR el que promueve la proliferación celular y el α_{1b} -AR la inhibe (74). Es claro que las respuestas generadas por cada receptor pueden variar según el tejido o tipo celular (74).

iii) COMUNICACIÓN CRUZADA (Cross-talk).

Igualmente, se ha demostrado que los α_{1b} -AR son capaces de modular la respuesta a la interleucina 6 (IL-6), una citocina implicada en funciones como la hematopoiésis, respuestas inmune, humoral y neuronal o en la regulación del sistema hepático al producir una gran cantidad de proteínas de fase aguda. La activación de los α_{1b} -AR disminuye notablemente la acción del factor de transcripción STAT3 activado por IL-6 (75). El mecanismo molecular no se conoce todavía.

La transmodulación del α_{1b} -AR por otros receptores se ha demostrado con claridad. Receptores de siete dominios transmembranales, por ejemplo, los receptores de endotelina-1 o receptores del ácido lisofosfatídico, son capaces al ser activados por su ligando de inducir la fosforilación y desensibilización de este receptor adrenérgico (76 y 77). Además, la fosforilación del α_{1b} -AR se incrementa también por receptores que responden a factores de crecimiento como el EFG-R y el PDGF-R que tienen actividad intrínseca de cinasa de residuos de tirosina, fosforilación asociada con la desensibilización del receptor (78).



5. Comunicación cruzada (Cross-talk) entre el sistema de transducción del α_{1b} -AR, el sistema de transducción del receptor del factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) y el sistema del receptor del ácido lisofosfatídico (R-LPA). Los tres subtipos de receptores energéticos inducen la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), la cinasa del extremo amino terminal de la proteína JUN (JNK) y de p38. Los factores de transcripción fosforilados por estas cinasas, incluyendo a la PKC, regulan la expresión de una gran cantidad de genes. La activación tanto del R-EGF como del R-LPA induce la internalización y desensibilización del α_{1b} -AR a través de un mecanismo en el que participa PI-3K. Al parecer, el dímero $\beta\gamma$ de las proteínas Gq y Gi tiene un papel clave en la comunicación de estos sistemas. El símbolo (?) significa que la interacción entre las cinasas todavía no se ha probado experimentalmente, algunos resultados obtenidos en nuestro grupo y en otros sugieren esta secuencia en la amplificación de la señal.

VI. ANTECEDENTES DEL TRABAJO DE TESIS

En general, la fosforilación de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G está asociada a la desensibilización del receptor, mientras que su desfosforilación está asociada a la resensibilización (39 y 40).

La noradrenalina incrementa la fosforilación del α_{1b} -AR (76) y los sitios potenciales de fosforilación que se han definido como importantes en la desensibilización homóloga del α_{1b} -AR son las serinas 404, 408 y 410, sustratos de las cinasas específicas del receptor (GRKs) (70).

La respuesta α_{1b} -adrenérgica también es modulada negativamente por activadores de la PKC como el forbol-miristato-acetato (PMA), un éster de forbol que se conoce como promotor de tumores (79). El mecanismo molecular que causa la pérdida de respuesta del receptor, al parecer, se asocia a la fosforilación del extremo carboxilo porque promueve un cambio conformacional que lo desacopla de la proteína G (80) y permitiendo su internalización en vesículas de clatrina (81). Un estudio muestra claramente, utilizando anticuerpos marcados con fluoresceína dirigidos contra los α_{1b} -AR, que la distribución de los receptores cambia de la membrana plasmática al interior de la célula cuando se activan por el agonista (82).

Los sitios fosforilados α_{1b} -AR por la PKC son las serinas 394 y 400 que forman parte del extremo carboxilo de la proteína, la fosforilación de estos residuos inducen la desensibilización heteróloga del receptor al participar una cinasa que depende de segundos mensajeros (70).

Otros receptores de siete dominios transmembranales al ser activados por su ligando específico, sea endotelina-1 o el ácido lisofosfatídico promueven la fosforilación del receptor α_{1b} -AR, acompañada de la pérdida de la respuesta al agonista. Igualmente receptores de factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasa de tirosina, tales como el EGF y el PDGF promueven la fosforilación de este receptor, algunos trabajos sugieren que la señalización de todos los receptores mencionados convergen en la activación de la PKC (76, 77 y 78).

Un número importante de estudios realizados con el α_{1b} -AR indican que la fosforilación del receptor es un evento clave en la regulación de su función. En todos ellos ha tenido mayor énfasis el estudio de la participación de las cinasas de proteínas lo que da como resultado un avance significativo en esta área, sin embargo, sólo se tiene conocimiento del papel general que juega la PKC en la regulación del receptor, sin dilucidar a la fecha el papel específico de cada una de las isoformas, y por otro lado, no se ha realizado ningún estudio de la participación de las fosfatasas de proteínas en este fenómeno de desensibilización y resensibilización del α_{1b} -AR. Recientemente, se demostró que el receptor β_2 -AR forma parte de un complejo mediado por la proteína de anclaje llamada gravina (AKAP 250) la cual asocia a elementos que participan en la fosforilación y regulación del receptor como cinasas, fosfatasas y proteínas que se requieren en la internalización (83).

VII. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El α_{1b} -AR se fosforila en respuesta a su agonista, a agentes que activan a la PKC y a otras hormonas con receptores específicos, en ella participan básicamente tres clases de cinasas, las dependientes de segundos mensajeros, las específicas de los receptores de siete dominios transmembranales y receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina. Probablemente el estado de fosforilación del α_{1b} -AR se mantiene por la acción de fosfatasas de proteínas de los tipos 1, 2A y/o 2B.

El nivel de fosforilación basal del α_{1b} -AR se incrementa cuando hay inhibición de las fosfatasas, probablemente una cinasa se encuentra localizada próxima al receptor, en particular pensamos en la PKC ya forma parte del sistema transduccional de este receptor.

La fosforilación del α_{1b} -AR por la PKC o por GRKs se asocia con la pérdida de capacidad del receptor para responder al estímulo, probablemente la fosforilación del α_{1b} -AR en la que participa la PKC, pero que se observa en ausencia de fosfatasas tiene como consecuencia la pérdida total o parcial de la respuesta.

La transducción de señales mediada por módulos protéicos en donde participan elementos que regulan al receptor se ha observado en varios sistemas, probablemente el α_{1b} -AR se asocia a cinasas y a fosfatasas que participan en la modulación de su estado de fosforilación.

VIII. OBJETIVOS

Durante el desarrollo del presente proyecto de investigación y con base en los antecedentes arriba descritos, se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Definir la participación de las proteínas fosfatasa en el estado de fosforilación y en la función del receptor α_{1b} -adrenérgico (α_{1b} -AR) sobreexpresado de manera permanente en fibroblastos de la línea celular Rat-1, e identificar la clase de fosfatasa y la(s) isoforma(s) de PKC que mantienen el estado de fosforilación del receptor.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si el estado de fosforilación del α_{1b} -AR es regulado por la acción de proteínas fosfatasa (PPs).
 - A) Efecto de inhibidores específicos de PPs sobre el estado de fosforilación del receptor.
 - B) Curso temporal de fosforilación del α_{1b} -AR en respuesta al ácido okadaico.
 - C) Dosis-respuesta del ácido okadaico sobre la fosforilación del α_{1b} -AR.
2. Definir cual(es) son la(s) proteína(s) cinasa(s) que participan en la vía que lleva a la fosforilación del α_{1b} -AR y cuya acción es la contraparte de las PPs.
 - A) Efecto de inhibidores específicos de la PKC sobre el estado de fosforilación del α_{1b} -AR inducida por la inhibición de PPs.
 - B) Efecto de inhibidores de cinasa de residuos de tirosina y de la PI-3K.
 - C) Determinar si existe asociación de isoformas de la PKC con el α_{1b} -AR.
3. Determinar si el estado de fosforilación del α_{1b} -AR, consecuencia de la inhibición de las PPs influye en la función del receptor.
 - A) Medir la liberación de calcio intracelular en respuesta a la activación del α_{1b} -AR fosforilado por adrenalina en células previamente tratadas con un inhibidor de fosfatasa.
 - B) Medir la producción de IP_3 en respuesta a la activación del α_{1b} -AR fosforilado por adrenalina en células previamente tratadas con un inhibidor de fosfatasa.
 - C) Medir la interacción del α_{1b} -AR fosforilado con la proteína G luego de que se extraigan membranas de células previamente tratadas con un inhibidor de fosfatasa.

IX. MÉTODOS

1. Cultivo de células Rat-1. Los fibroblastos de pulmón embrionario de rata de la línea celular Rat-1 fueron transfectados de manera estable con el receptor α_{1b} -AR. La línea celular fue donada por los Dres. R. J. Lefkowitz, M.G. Caron y L. Allen de la Universidad de Duke, USA. Las células Rat-1 se mantienen en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium de GIBCO BRL) en un atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C .

2. Inmunoprecipitación del receptor α_{1b} -AR. Se empleó un anticuerpo policlonal de conejo generado contra los últimos diez aminoácidos del extremo carboxilo del receptor. La inmunoprecipitación se estandarizó en un trabajo anterior por fotomarcaje del receptor en membranas plasmáticas utilizando [^{125}I]-azidoprazosina (76).

3. Fosforilación del receptor α_{1b} -AR. Antes del experimento, los cultivos confluentes de células Rat-1 se ponen en ayuno en medio DMEM sin suero por 12 horas. El día del experimento las células se mantienen 1 hora en DMEM sin fosfatos y posteriormente se marcan metabólicamente con [^{32}P]-Ortofosfato. Al término del marcaje las células se estimulan con los diferentes agentes por los tiempos indicados en las figuras de los resultados. Las células se lavan con PBS y se les agrega la solución de lisis fría que contiene inhibidores de proteasas. Las cajas se colocan en un baño de hielo por 1 hora. Finalmente el lisado se pasa a tubos eppendorf que contienen el anticuerpo y la proteína A-Sefarosa. El receptor se inmunoprecipita durante toda la noche a 4°C con agitación constante.

4. Medición de calcio intracelular. Los cultivos confluentes de células Rat-1 se cargan con $5\ \mu\text{M}$ de FURA-2 por 1 hora y se lavan varias veces con una solución Krebs-Ringer-Hepes pH 7.4 y albúmina de suero de bovino al 0.05%. Posteriormente las células se incuban con ácido okadaico (AO) y con el éster de forbol (PMA) por 15 minutos, las células se despegan de las cajas de cultivo con tripsina y se resuspenden en la misma solución. En estas condiciones las mediciones de liberación de calcio intracelular en respuesta a la noradrenalina se realizaron en un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman.

5. Medición de IP_3 . Las células de cultivos confluentes se marcan metabólicamente con $6\ \mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]mio-inositol por 18 horas en DMEM libre de inositol. Las células se lavan en una solución que contiene CaCl_2 $1.3\ \text{mM}$ y se preincuban con LiCl $10\ \text{mM}$ durante 15 minutos. Posteriormente las células se incuban con hormonas o agentes durante 15 minutos y al término de la incubación la producción de fosfatos de inositol se detiene con $200\ \mu\text{l}$ de ácido perclórico al 30%. Los sobrenadantes se neutralizan y los fosfatos de inositol marcados con [^3H] se separan por cromatografía de intercambio iónico en columnas de Dowex AG1-X8

6. Determinación de la unión de [³⁵S]GTP γ S a membranas plasmáticas. Los cultivos confluentes en ayuno toda la noche, se tratan con AO, PMA o con ambos agentes durante 5 o 15 minutos, se lavan con PBS y se resuspenden en 1 ml de la solución fría de HEPES 20 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, Na₃VO₃ 100 μ M, β -glicerofosfato 10 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, MgCl₂ 2 mM e inhibidores de proteasas. Las membranas se preparan de acuerdo al método de Mattingly (señalado en la referencia 76) que consiste en romper las células con un homogenizador Dounce y centrifugar a 3500 rpm por 20 minutos para quitar los restos celulares. Finalmente las preparaciones se centrifugan a 13000 rpm por 20 minutos. Las membranas se resuspenden en una solución de Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y MgCl₂ 10 mM. La unión de [³⁵S]GTP γ S se determina en un volumen final de 250 μ l durante 30 min a 30 °C con las membranas y la hormona. La reacción se termina con una solución fría del mismo medio y las muestras se filtran en el Brandel sobre filtros Whatman GF/C, se lavan y se cuentan con líquido de centelleo.

7. Coinmunoprecipitación. El receptor se inmunoprecipita como en el punto 2. Posteriormente, las perlitas de proteína A-Sefarosa se centrifugan a 3000 rpm durante 1 min, se tira el sobrenadante y se lava 4 veces con una solución fría de HEPES 50 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 100 mM pH 7.2, Nonidet-P40 al 0.1% y NaF 100 mM. Los complejos inmunes se resuspenden en solución de Laemmli y se realiza una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% a 30 mA por gel. Las proteínas separadas por electroforesis se transfieren a membrana de nitrocelulosa y en el inmunoanálisis se emplean anticuerpos policlonales específicos que reconocen a las isoformas α , δ , ϵ y ζ de la PKC.

X. RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo se presentan en dos artículos, el primero de ellos fue publicado en la revista *British Journal of Pharmacology* (2000) 129:724-730. En este trabajo nosotros estudiamos el papel de las fosfatasa en el estado de fosforilación del α_{1b} -AR. Los resultados muestran que el AO incrementa la fosforilación del receptor de manera dependiente del tiempo y de la concentración.

Para identificar el tipo de fosfatasa que participa en el estado de fosforilación del α_{1b} -AR utilizamos inhibidores selectivos para la PP1, la PP2A y la PP2B. Los resultados indican que se incrementa la fosforilación basal del α_{1b} -AR con inhibidores para los tres tipos de fosfatasas.

Para identificar el tipo de cinasa de proteína que participa en el estado de fosforilación del α_{1b} -AR cuando se inhibe a las fosfatasas utilizamos inhibidores selectivos de la PKC, de cinasas de residuos de tirosina y de la PI-3K. Observamos que el estado de fosforilación basal del receptor y el que se origina por el AO son modulados principalmente por la PKC, ya que tanto la estaurosporina como el Ro 318220 disminuyeron la fosforilación en ambos casos.

Para determinar el efecto funcional del cambio en el estado de fosforilación del α_{1b} -AR por AO determinamos dos parámetros en la células *in vivo*, la concentración intracelular de calcio y la producción de IP₃. Los resultados nos sugieren claramente que el estado de fosforilación del receptor en uno u otro caso, es decir, por activación de la PKC o por la inhibición de las fosfatasas, es distinto; mientras que en el primero el receptor pierde la capacidad de responder a un estímulo por tiempo prolongado, en el segundo caso no afecta la función del receptor. No conocemos el significado de este cambio en el estado de fosforilación del α_{1b} -AR.

Con el fin de conocer si la fosforilación del receptor en presencia de AO afecta la interacción del receptor con su proteína G medimos la unión de [³⁵S]GTP γ S en membranas de células previamente tratadas con noradrenalina, AO y PMA. Observamos una disminución del 10% de la unión de GTP γ S a las membranas cuando fueron tratadas previamente con AO, disminución insuficiente para que el α_{1b} -AR no pierda la capacidad de respuesta ante el estímulo. Sin embargo el tratamiento con la hormona o con PMA sí disminuyen notablemente la interacción receptor-proteína G.

El segundo manuscrito fue enviado a consideración para su publicación a la revista *European Journal of Pharmacology*. En este trabajo nosotros estudiamos por coimmunoprecipitación la asociación del α_{1b} -AR con varias isoformas de la PKC en respuesta al PMA y a hormonas que inducen un incremento en el estado de fosforilación del receptor, con el fin de demostrar que esta cinasa se encuentra localizada muy cercana al α_{1b} -AR, ya que observamos inicialmente que la fosforilación del α_{1b} -AR se incrementa simplemente por la ausencia de fosfatasas. Los resultados indican que el receptor puede asociarse con las isoformas α , δ y ϵ de forma dependiente del activador de PKC y del tiempo. Además, la magnitud de la asociación es distinta para cada isoforma dependiendo del estímulo.

XI. DISCUSIÓN

Muchos procesos celulares son regulados por cambios conformacionales de las proteínas debidos a la fosforilación, modificación que se mantiene en equilibrio por las acciones antagónicas de cinasas y de fosfatasa de proteína (5).

En eucariontes, la gran cantidad de genes de cinasas que existe, con respecto al de las fosfatasa, sugiere que las cinasas tienen sustratos específicos, mientras que las fosfatasa tienen menor especificidad por el sustrato, por lo que la localización de estas enzimas *in vivo* es muy importante para su función (6).

La investigación dirigida al estudio de la regulación de ambas enzimas ha demostrado que esta es muy compleja, simplemente por el hecho de que ambas son blanco, igualmente de cinasas y de fosfatasa, de metiltransferasa, de iones, de segundos mensajeros y de fosfolípidos (1, 2, 5, 6 y 16), aunado al hecho de que la combinación de un gran número de subunidades da lugar a isoformas distintas como ocurre con la PP2A por ejemplo, de la cual se forman al menos nueve proteínas diferentes a partir de las subunidades A, B y C (6). Lo mismo ocurre con las cinasas, en particular con la PKC de la cual se han identificado 12 isoformas, cada una con requerimientos específicos (18 y 19). Sin olvidar que también existen otras cinasas, como aquellas que fosforilan residuos de tirosina, de histidina y de aspartato (1) y otras fosfatasa conocidas como ácidas o básicas en bacterias o fosfatasa de residuos de tirosina en células de mamífero (6) y de las cuales no he hecho mención. Probablemente la existencia de esta diversidad de enzimas pueda explicar parte del porqué de la enorme dificultad para determinar con precisión su papel en los distintos fenómenos celulares en los que participan.

FOSFORILACIÓN DE RECEPTORES. En el sistema transduccional de los receptores acoplados a proteínas G, la fosforilación de los receptores por cinasas activadas por segundos mensajeros tales como la PKC y la PKA, por cinasas específicas de estos receptores llamadas GRKs o por receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina, ocupa un lugar muy importante. Generalmente la fosforilación se asocia con la pérdida parcial o total de la respuesta a un estímulo por tiempo prolongado, mientras que a la resensibilización, es decir a la recuperación de la capacidad de responder al estímulo, se le relaciona con la desfosforilación de los receptores (31).

A la fecha, se sabe que los tres subtipos de α_1 -ARs son fosforilados en respuesta a la activación de la PKC y como respuesta al agonista en donde participan las GRK2 y GRK3 (76, 84 y 85). Por mutagénesis dirigida, se identificaron cinco sitios blanco de fosforilación en el extremo carboxilo del α_{1b} -AR, las serinas 394, 400, 404, 408 y 410, la consecuencia de la fosforilación de estos residuos es la desensibilización del receptor (70 y 71) que se asocia tanto, con el desacoplamiento entre el receptor y la proteína G (76 y 86) como con la internalización del receptor en vesículas o endosomas (85 y 87). Por otro lado, la participación de las fosfatasa en el mantenimiento del estado de fosforilación del α_1 -AR aún no se había descrito, ni tampoco se tenía conocimiento acerca de las isoformas de la PKC que fosforilan a este tipo de receptor adrenérgico. Nosotros

somos los primeros en demostrar, por una parte que la inhibición de fosfatasa de los tipos 1, 2A y 2B empleando inhibidores selectivos y permeables a la membrana celular, cambia el estado de fosforilación basal del α_{1b} -AR de forma dependiente de la concentración y del tiempo. En este evento participa principalmente la PKC, mientras que otras cinasas como son la PI-3K o cinasas de residuos de tirosina, que no obstante forman parte de la señalización de los receptores para bradicinina, endotelina-1, ácido lisofosfatídico o para factores de crecimiento que son capaces de incrementar la fosforilación del α_{1b} -AR no participan, ni en la fosforilación basal ni en la que se observa por inhibición de las fosfatasa, lo que sugiere que estos receptores activan vías en las que participan proteínas específicas que inducen un incremento en la fosforilación de este receptor adrenérgico, pero que convergen sólo en la activación de la PKC. Sin embargo, el mecanismo molecular de estos receptores todavía falta por precisarse ya que en algunos casos la fosforilación del α_{1b} -AR es transitoria y en otros casos es sostenida como sucede por acción del ácido lisofosfatídico que induce una fosforilación del receptor que se mantiene elevada por 1 hora. El mecanismo de regulación del α_{1b} -AR por esta hormona tal vez involucre además de la activación de la PI-3K y de la PKC, la inhibición de fosfatasa o la activación de alguna isoforma específica de la PKC o incluso la activación de otras cinasas aún no caracterizadas en la vía que lleva a la fosforilación del receptor.

La fosforilación del α_{1b} -AR en residuos de tirosina no se ha demostrado si bien, la secuencia primaria del α_{1b} -AR indica que tiene residuos de tirosina tanto, en la tercera asa citoplásmica como en el extremo carboxilo (76, 77 y 78).

MECANISMO DE DESENSIBILIZACIÓN. El mecanismo molecular de este fenómeno celular se ha esclarecido, en gran parte, utilizando como modelo al β_2 -AR. Se ha descubierto que muchos otros receptores que pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales siguen el mismo comportamiento, sin embargo, todavía existe controversia en algunos puntos acerca del mecanismo, aún en el caso del β_2 -AR. La prueba está en que un estudio realizado recientemente con el extremo carboxilo del β_2 -AR recombinante en bacterias señala que para que se lleve a cabo la fosforilación del receptor por la PKA, PKC, GRK y por el receptor de insulina que tiene actividad intrínseca de cinasa de tirosinas, es indispensable primero una conformación específica de la región blanco de las cinasas, ya que si las cisteínas 341 y 378 del receptor se cambian por otro aminoácido ahora no se forma un enlace disulfuro que se requiere para su fosforilación. Es decir, no obstante que esta modificación postraduccional es crucial en el mecanismo de desensibilización del β_2 -AR también se requiere de otros eventos importantes, pero independientes de la fosforilación (88).

Se ha observado que el mecanismo molecular de desensibilización para varios receptores de siete dominios transmembranales es similar al mecanismo descrito para el β_2 -AR. El receptor del péptido intestinal vasoactivo por ejemplo, es fosforilado en respuesta al agonista, tanto por la PKA como por la GRK y la modificación del receptor se relaciona directamente con su internalización ya que se observa que éste se acumula en el interior de la célula de forma muy localizada

y dependiente de la temperatura, de la concentración del agonista y del tiempo, y por lo tanto, con la pérdida de respuesta a un estímulo posterior (89). Sin embargo, también es claro que el mecanismo molecular de desensibilización del β_2 -AR no es posible de extrapolarlo a todos los receptores. Algunas evidencias sugieren que una disminución de la respuesta de un receptor no siempre está determinada por su estado de fosforilación, así por ejemplo, en el sistema de transducción del receptor de tromboxano el cual se desensibiliza por fosforilación se observó que cuando está mutado en el extremo carboxilo específicamente en las serinas 321, 322 y 328, residuos blanco de fosforilación de la PKC, éste continúa susceptible a perder su capacidad de respuesta al agonista. Es decir, en este receptor la fosforilación del carboxilo terminal contribuye a la desensibilización, pero posiblemente también participan otros eventos en su regulación (90). Otro ejemplo que muestra la complejidad de este fenómeno biológico es el receptor de lutropina. Anteriormente, se había determinado que el receptor es fosforilado y desensibilizado, sin embargo, un estudio más reciente demuestra que independientemente de que se encuentre fosforilado el extremo carboxilo del receptor éste puede internalizarse, únicamente por el hecho de ser activado por su agonista (91). Igualmente, nuestros resultados sugieren que la fosforilación de receptores acoplados a proteínas G, en este caso del α_{1b} -AR, no siempre es sinónimo de desensibilización. Observamos que el α_1 -AR no se insensibiliza al ligando cuando se inhibe a las fosfatasas de los tipos 1, 2A y 2B, no obstante que su fosforilación basal se incrementa con una magnitud similar a la que se observa por la activación de la PKC. Dado que en ambos casos participa la PKC, creemos que la diferencia funcional de las fosforilaciones sobre el α_{1b} -AR se debe probablemente a que ocurre sobre sitios distintos, unos son fosforilados en respuesta al PMA y otros en respuesta al AO, los primeros permiten la asociación de la arrestina con el receptor para bloquear su acoplamiento con la proteína G, los segundos no. Otra posible explicación de las diferencias funcionales de la fosforilación del α_{1b} -AR es que proteínas específicas estén involucradas en el mecanismo de desensibilización que no participan cuando el receptor se fosforila en ausencia de fosfatasas, pero sí cuando se activa a las cinasas. Al menos en el sistema transduccional del receptor 2 de la vasopresina (V2-R) no participan las arrestinas en el mecanismo de desensibilización, como ocurre en el sistema del β_2 -AR. Para el V2-R se ha demostrado que su desensibilización se relaciona con la fosforilación de múltiples sitios del carboxilo terminal y que algunos son importantes para prevenir su regreso a la superficie, pero aquí no se requiere de la interacción física entre la arrestina y el receptor (85).

Un hecho que respalda que son distintos los sitios que se fosforilan por efecto del PMA o por efecto del AO es que si tratamos a los fibroblastos Rat-1 con estos agentes al mismo tiempo, entonces sí se abate la respuesta del receptor a la hormona. Sin embargo, no podemos precisarlos porque no observamos aditividad de los dos agentes en los ensayos de fosforilación *in vivo*. El análisis de fosfopéptidos del receptor hidrolizado después del tratamiento con PMA y/o AO, así como realizar ensayos de fosforilación en los que se desfase el tiempo de exposición entre ellos empleando concentraciones subóptimas para evitar que se obtenga la máxima fosforilación del receptor con uno solo de los agentes, tal vez

nos permita en un futuro resolver la hipótesis anterior. Indirectamente definir por análisis de coimmunoprecipitación de proteínas si el α_{1b} -AR se asocia con las mismas isoformas de la PKC en respuesta al AO que en respuesta al PMA, podría permitirnos proponer si son o no, distintas las fosforilaciones sobre el receptor.

Lo que sí sabemos es que la fosforilación del α_{1b} -AR por AO no altera su acoplamiento con la proteína G, a diferencia de lo que se ha observado en trabajos previos con el PMA en donde la disminución de la función del α_{1b} -AR se relaciona directamente con su desacoplamiento de la proteína G (76 y 77).

Aún no conocemos el significado fisiológico del cambio en el estado de fosforilación del receptor cuando no hay actividad de fosfatasa tipo 1, 2A y/o 2B, pero consideramos que la fosforilación puede ser importante para que el receptor dispare la señalización hacia otra respuesta específica que no tenga que ver con su desacoplamiento de la proteína G o con su internalización, si la fosforilación permite ahora su asociación con otras proteínas, por ejemplo.

Por otra parte, es claro que el mecanismo de la resensibilización de receptores acoplados a proteínas G ha sido poco estudiado con respecto a la desensibilización, pero se piensa que el estado de fosforilación de los receptores juega un papel clave. Al menos se ha observado en los sistemas del β_2 -AR y del V2-R que es indispensable su desfosforilación cuando se encuentran en las vesículas para que puedan regresar a la superficie de la membrana plasmática (40 y 85).

MÓDULOS TRANSDUCCIONALES EN EL MECANISMO DE DESENSIBILIZACIÓN. Recientemente se observó que el β_2 -AR forma módulos con proteínas que participan en su regulación por fosforilación y con proteínas que forman parte de la maquinaria endocítica tales como la PKA, PKC, GRK2, PP2A, PP2B, la clatrina, la arrestina y el adaptador AP-2 (del inglés: Adaptor Protein-2) (92). Todas ellas se anclan al receptor a través de la proteína AKAP de 250 kDa llamada gravina (83). Además, el β_2 -AR activado por su agonista también puede formar heterodímeros con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) al que transactiva, de tal forma que éste enciende la cascada de cinasas que da lugar a la estimulación de la MAPK. Así, el β_2 -AR por medio de la formación de complejos multiprotéicos con otras proteínas ajenas a su sistema de transducción regula respuestas celulares proliferativas (93).

Por análisis de coimmunoprecipitación de proteínas nosotros demostramos que el α_{1b} -AR se asocia con las isoformas α , δ y ϵ de la PKC (Fig.7) lo que sugiere que este receptor también forma módulos protéicos con elementos que participan en su regulación por fosforilación. La asociación α_{1b} -AR/PKC es un evento dinámico en el que posiblemente la PKC se disocia para que en su lugar la fosfatasa lo desfosfore. Falta demostrar la posible asociación del α_{1b} -AR y las fosfatasa, así como la interacción del receptor con otros elementos que participan en la desensibilización como las arrestinas o la clatrina, e identificar la proteína adaptadora que mantiene en cercanía a todos estos elementos con el receptor. Hace poco tiempo se demostró que el α_{1b} -AR activado por la fenilefrina, un agonista, coimmunoprecipita con la cinasa JAK2 y con el factor de transcripción STAT1 (94) (Fig.7), por lo que es muy probable que también la intercomunicación

de este receptor adrenérgico con otras vías de señalización esté mediado por módulos transduccionales.

Muchos estudios en diversos sistemas transduccionales indican que la formación de diferentes módulos que involucran a un mismo receptor, depende del tipo celular y de las proteínas que este expresa. Así, toda proteína con alguno de los dominios de interacción proteína-proteína puede unirse a otra a través del dominio correspondiente y modular su función, ya sea porque la fosforile, la desfosforile, o porque se une a un sitio que impide un cambio conformacional, etcétera.

REGULACIÓN DE CINASAS Y DE FOSFATASAS. El hecho de que cinasas, fosfatasa y otros elementos se encuentren asociados íntimamente a un receptor ha evolucionado la idea de que el receptor es modulado en respuesta a la activación de vías de transducción que se conforman por proteínas aisladas inmersas en el citoplasma, y ha permitido en parte, explicar la especificidad y rapidez con la que se observa una respuesta. Sin embargo, la comprensión total de la regulación de los receptores por fosforilación aún se percibe con enorme complejidad porque falta por entender la regulación de las enzimas que participan y el papel que tiene cada una en la transmisión de la señal en respuesta al estímulo. El hecho de que, tanto cinasas como fosfatasa sean blanco de fosforilación o incluso de autofosforilación y autodesfosforilación, sugiere por demás, que se requiere de una modulación precisa de los componentes transduccionales. Sólo por mencionar un ejemplo se puede resumir con base a otros estudios que la PP1 y la PP2A regulan negativamente a la PKC α , y la PKC α a su vez, puede fosforilar e inactivar transitoriamente a la PP2A. Por su parte, la PP1 es inhibida por DARPP32, cuyo estado de fosforilación es controlado por la PKA y la PP2A. Además, la PP2A se autodesfosforila y la PKC α se autofosforila (Fig.7). Sin embargo, aún cuando estas enzimas formaran parte del complejo multiprotéico del sistema del α_{1b} -AR no podemos asegurar que su regulación opera de la misma forma a la que se ha descrito previamente, ni tampoco podemos definir cuál es la secuencia de eventos que llevan a la fosforilación y regulación del α_{1b} -AR.

XII. CONCLUSIÓN

Podemos concluir que el estado de fosforilación del α_{1b} -AR sobreexpresado en fibroblastos Rat-1 es regulado dinámicamente por la acción de proteínas fosfatasa de los tipos 1, 2A y 2B, y por las isoformas de la PKC α , δ y ϵ que coimmunoprecipitan con él de forma diferencial dependiendo de la isoforma y de la vía transduccional que lleva a la activación de la cinasa (Fig. 7).

Un cambio en el estado de fosforilación del α_{1b} -AR no siempre es sinónimo de desensibilización, la inhibición de las fosfatasa permite observar un incremento del estado basal de fosforilación del receptor, pero sin que se altere su

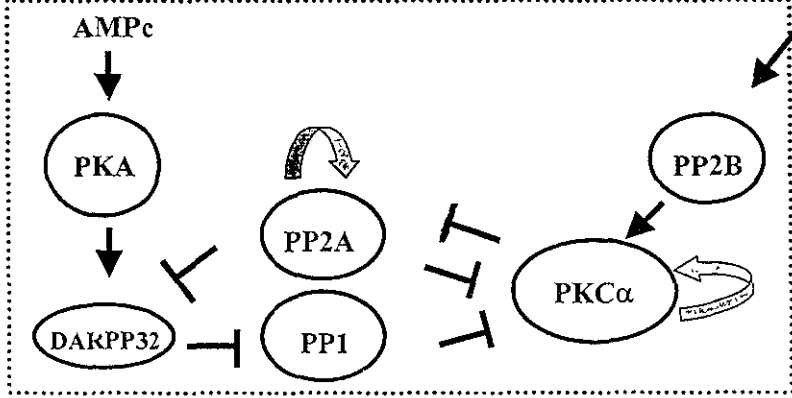
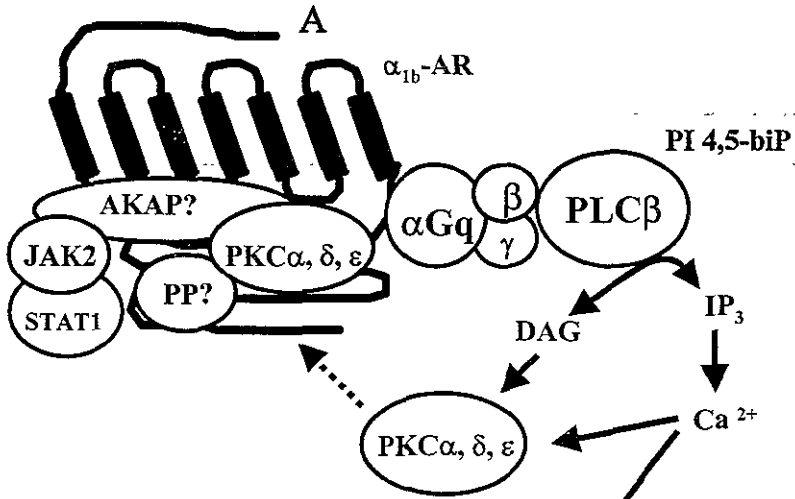


Fig.7. El receptor α_{1b} -adrenérgico (α_{1b} -AR) probablemente forma un complejo dinámico con cinasas y fosfatasa que modulan su estado de fosforilación, independientemente de su acoplamiento con la proteína G heterotrimérica. Por un lado, la inhibición de las fosfatasa tipo 1, 2A y 2B permite observar un incremento de la fosforilación del receptor mediada por la PKC, y por otro lado demostramos que el α_{1b} -AR coimmunoprecipita con varias isoformas de esta cinasa, además de JAK2 y STAT1 (demostrado por otro grupo). La regulación de proteínas por fosforilación es compleja ya que igualmente cinasas y fosfatasa son blanco de fosforilación. En el recuadro podemos observar a manera de resumen y con base en otros estudios que al menos la PKC α es regulada por PP1, PP2A y PP2B. A su vez, estas fosfatasa son reguladas por PKC α o por segundos mensajeros que se producen, ya sea como respuesta a la activación del propio sistema del α_{1b} -AR tales como el calcio que activa a la PP2B o por aquellos que se generan por la activación de receptores distintos como el AMPc que activa a la PKA que fosforila a DARPP32 que inhibe a la PP2B. La acción de PP1 y PP2A tiene un efecto positivo sobre la actividad de PKC α , mientras que la PP2B tiene efecto negativo, PKC α además se autofosforila y PP2A se autodesfosforila. \rightarrow (activación) \leftarrow (inhibición) $\cdots\rightarrow$ (translocación)

función. Aún no conocemos el significado biológico de esta fosforilación del receptor.

XIII. PERSPECTIVAS

Las preguntas a resolver referentes al papel que tiene el cambio en el estado de fosforilación del α_{1b} -AR en respuesta a determinados inductores de la PKC o de otras cinasas, la caracterización precisa del tipo de fosfatasa que participa, la determinación de los sitios blanco específicos de la PKC, PKA, GRKs o de otras cinasas sobre el α_{1b} -AR son clave para entender la regulación de este sistema transduccional.

Por otro lado, los conocimientos de ciencia básica que implican la regulación por fosforilación del α_{1b} -AR y de los otros receptores adrenérgicos pueden ayudar a estudios con fines prácticos dentro de la clínica que permitan detectar blancos proteicos y proponer terapias para padecimientos que dependen de alteraciones relacionadas con estos receptores.

Por último quiero comentar que existen otras herramientas que serían de gran ayuda para contestar al menos en parte, algunas de las preguntas que quedan por contestar después de este estudio, como son la caracterización de cada proteína participante y la determinación del papel que juegan en el sistema del α_{1b} -AR. Una de ellas es la transfección de células con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el RNAm de cada isoforma, tanto de la PKC como de los diferentes tipos de fosfatasas para eliminar específicamente la actividad de cada proteína (29). Otra herramienta es la detección espectrofluorométrica por BRET (del inglés: Bioluminescence Resonance Energy Transfer) que se basa en la detección de la transferencia de energía de una proteína a otra cuando ambas se encuentran lo suficientemente cerca una de otra. Previamente una de las proteínas se fusiona genéticamente al donador de energía, la proteína luciferasa de *Renilla liciferasa* y la otra proteína se fusiona con el aceptor de la energía, la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (95).

Además, el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra sitios fosforilados específicos del receptor sería de gran utilidad para clonar e identificar las cinasas y las fosfatasas que participan en su regulación o para definir cuál es el residuo fosforilado y si este residuo se relaciona a un estímulo determinado o a una función específica del receptor, etcétera (96 y 97).

XIV. REFERENCIAS

1. Mizuno, T. (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J. Biochem.* 123:55-563.
2. Stock, J.B., Ninfa, A. J. y Stock, A. M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53(4):450-490.
3. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1994) Cell Signaling. *Molecular Biology of the cell. Cap.15:721-785.*
4. Leninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. (1993) Principles of Biochemistry. Segunda Edición. N. Y. págs;777 a 779 y 925 a 938.
5. Cohen P (1992) Signal integration at the level of protein kinases, proteinphosphatases and their substrates. *Trends. Biochem. Sci.* 17:408-413.
6. Vincent, J. B. y Crowder, M. W. (1996) Phosphatases in cell metabolism and signal transduction: Structure, function and mechanism of action. Editorial RG Landes Company. Austin, Texas U.S.A, 198 pp.
7. Guan, J., Haunm R. S., Watson, S. J., Geahlon, A. L, Dixon, J. E. (1990) Cloning and expression of a protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:1501-1505.
8. Chernoff, J., Schievella, A. R., Jost, C. A, Erickson, R. L. y Neel, B. G. (1990) Cloning of cDNA for a major human protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2735-2739.
9. Barford, D., Flint, A.,J. y Tonks, N. K. (1994) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:1624-1627.
10. Klummp, S., Selke, D., Fisher, D., Baumann, A., Muller, F. y Thanis, S. (1998) Protein Phosphatases type-2 isozymes present in vertebrate retinal: purification, characterization, and localization in photoreceptors. *J. Neurosc. Res.* 51:328-338.
11. Hubbard, M. J. y Cohen, . (1989) The glycogen binding subunit of protein phosphatase 1G form rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 180:457-465.
12. Lee, M. S., Ogg, S., Xu, M., Parker, L. L., Donoghue, D. J., Malle, J. L. y Piwnica-Worms, H. (1992) cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Mol. Biol. Cell.* 3:73-84.
13. Wera, S. y Hemmings, B. H. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.* 311:17-29.
14. Miskin, J. E., Abrams, Ch. C., Goatley, L. C. y Dixon, L. K. (1998) A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science.* 281: 562-565.
15. Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases-New avenues for cell regulation. *Annu Rev. Cell. Biol.* 10:55-86.
16. Zolnierowicz, S. (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 69(8):1225-1235.
17. Sundarsen, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K. y Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction *Science.* 270:296-299.
18. Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258. 607-613

19. Newton, A. C. (1995) Protein Kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 48:28495-28498.
20. Mellor, H. y Parker, P. J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332:281-292.
21. Karanen, L. M., Dutil, E. M. Y Newton, A. C. (1995) Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* 5(12):1394-1403.
22. Ron, D., Vagts, A. G., Dohrman, D. P., Yaka, R., Jiang, Z., Yao, L., Grisel, J. E. y Diamond, I. (2000) Uncoupling of beta11 PKC from its targeting protein RACK1 in response to ethanol in cultured cells and mouse brain. *FASEB J.* 14(14):2303-2314.
23. Kilpatrick, L. E., Song, Y-H., Rossi, M. E. y Korchak, H. M. (2000) Serine phosphorylation of p60 tumor necrosis factor receptor by PKC- δ in TNF- α -activated neutrophils. *Am. J. Cell. Physiol.* 279:C2011-2018.
24. Gerot, E. M., Parker, P. J. y Cantrell, D. A. (1995) Analysis of the role of protein kinase C-alpha, -epsilon and -zeta in T cell activation. *J. Biol. Chem.* 270:9833-9859.
25. Kellerer, M., Mushack, J., Seffer, E., Mischak, H., Ullrich, A. y Haring H. M. (1998) Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor to inhibit the tyrosine activity of the insulin receptor in human kidney embrionic cells (HEK 293). *Diabetologia.* 41(7):833-838.
26. Kim, J. Y., Yang, M. S., Oh, C. D., Kim, K. T., Ha, M. J., Kang, S. y Chun, J. S. (1999) Signalling pathways leading to an activation of mitogen-activated protein kinase by stimulating M3 muscarinic receptor. *Biochem. J.* 337(pte.2):275-280.
27. Li, W., Zhang, J., Flechner, L., Hyun, T., Yam, A., Franke, T. F. y Pierce, J. H. (1999) Protein kinase C-alpha overexpression stimulates Akt activity and supresses apoptosis induced by interleukin 3 withdrawal. *Oncogene.* 18(47):6564-6572.
28. Way, K., Chou, E. y King, G. L. (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends. Pharmacol. Sci.* 21(5):181-187.
29. McCarthy, M. M., Auger, A. P., Mong, J. A., Sickel, M. J. y Davis, A. M. (2000) Antisense oligodeoxynucleotides as a tool in developmental neuroendocrinology. *Methods.* 22(3):239-248.
30. Wender, P. A., Cribbs, C. M., Koehler, K., Sharkey, N., Herald, Ch. L., Kamano, Y., Pettit, G. R. y Blumberg, P. M. (1988) Modeling of bryostatins to the phorbol ester pharmacophoro on protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(19):7197-7201.
31. García-Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J. y Medina, L. C. (2000) α 1-adrenoceptors: function an phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* 389:1-12.
32. Koenig, J. A. y Edwardson, J. M. (1997) Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *TIPS.* 18:276-287.
33. Harrison, C., Rowbotham, D. J., Grandy, D. K. y Lambert, D. G. (2000) Endomorphin-1 induced desensitization and down-regulation of the recombinant &mgr, opioid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 131(6):1220-1226.

34. Pitcher, J. A., Payne, E. S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A. y Lefkowitz, R. J. (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:8343-8347.
35. Menard, L., Ferguson, S. S., Zhang, J., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. y Barak, L. S. (1997) Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor and beta-arrestin determine kinetics of internalization. *Mol. Pharmacol.* 51(5):800-808.
36. Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., Lomasney, J. W., DeBernardis, J. F., Lefkowitz, R. J. y Caron, M. G. (1985) Phorbol esters promote α 1-adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:5651-5655.
37. Li, S., Liu, X., Min, L. y Ascoli, M. (2000) Mutations of the second extracellular loop of the human lutropin receptor emphasize the importance of receptor activation and de-emphasize the importance of receptor phosphorylation in agonist-induced internalization. *J. Biol. Chem.* Dec 15:1-26.
38. Willars, G. B., Muller-Esterl, W. y Nahorski, S. R. (1999) Receptor phosphorylation does not mediate cross talk between muscarinic M(3) and bradykinin B(2) receptors. *Am. J. Physiol.* 5(pte.1):C859-C869.
39. Karoor, V. y Malbon, C. C. (1996) Insuline-like growth factor receptor-1 stimulates phosphorylation of the β 2-adrenergic receptor in vivo on sites distinct from those phosphorylated in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 271:29347-29352.
40. Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A. y Lefkowitz, R. J. (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 272(1): 5-8.
41. Vanderbeld, B. y Kelly, G. M. (2000) New thoughts on the role of the betagamma subunit in G protein signal transduction. *Biochem. Cell. Biol.* 78(5):537-550.
42. Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K. y Lohse, M. J. (1999) Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5476-5481.
43. Schroder, S. y Lohse, M. J. (2000) Quantification of the tissue levels and function of the G-protein regulator phosducin-like protein. *Arch. Pharmacol.* 362(4-5):435-439.
44. Wieland, T. y Chiang-Kang, Ch. (1999) Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. *Arch. Pharmacol.* 360:14-26.
45. Pawson, T. y Nash, P. (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes and Dev.* 14:1027-1047.
46. Malarkey, K., Belham, C. M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P. H. y Plevin, R. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled-receptors. *Biochem. J.* 309:361-375.
47. Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Haganir, R. L. y Greengard, P. (1998) A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated

- phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulatés dephosphorylation of the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 18(24):10297-10303.
48. Westphal, R., Tavalin, S. J., Lin, J. W., Alto, N. M., Fraser, I. D. C., Langeberg, L. K., Sheng, M. y Scott, J. D. (1999) Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science.* 285:93-96.
 49. Tsunoda, S. y Zuker, C. S. (1999) The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in *Drosophila* photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling. *Cell Calcium.* 26(5):165-171.
 50. Feramisco, P., Oriente, F., Miele, C., Caruso, M., Auricchio, R., Vigliotta, G., Condorelli, G. y Beguino, F. (1998) In NIH-3T3 fibroblasts, insulin receptor interaction with specific protein kinase C isoforms controls receptor intracellular routing. *J. Biol. Chem.* 273:13197-13202.
 51. Scott, J. D. (1997) Dissection of protein kinase and phosphatase targeting interactions. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 52:227-239.
 52. Millward, T. A., Zolnierowicz, S. y Hemmings, B. A. (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *TIBS.* 24:186-191.
 53. García-Sáinz, J. A. (1995) Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. *Arch. Med. Res.* 26(3):205-212.
 54. Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Hieble, J. P., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Molinoff, P. B., Ruffolo, R. Jr. y Trendelenburg, U. (1994) IV International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46:121pp.
 55. Ahlquist, R. P. (1948) A study of the adrenergic receptors. *Am. J. Phys.* 153: 583-600.
 56. Lands, A. M., Arnold, A., McAulliff, J. P., Luduena, F. P. y Brown, J. T. G. (1967) Differentiation of receptors systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 214:597-598.
 57. Berend, N. y Marlin, G. E. (1978) Characterization of beta-adrenoceptor subtype mediating the metabolic actions of salbutamol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 5(3):207-211.
 58. Langer, S. Z. (1979) Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmembrane release. *Br. J. Pharmacol.* 60:481-497.
 59. Berthelsen, S. y Pettinger, W. A. (1977) A functional basis for the classification of α -adrenergic receptors. *Life Sci.* 21:595-606.
 60. Fain J. N. y García-Sáinz, J. A. (1980) Role of phosphatidylinositol turnover in alpha1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha2 effects of catecholamines. *Life Sciences.* 26:1183-1194.
 61. Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W. Y., Schwinn, D. A., Yang-Feng, T. L., Brownstein, M., Lefkowitz, R. J. y Caron, M. G. (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J. Biol. Chem.* 266:6365-6369.
 62. Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. y Kobilka, B. K. (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(19):7159-7163

63. Schwinn, D. A., Lomasney, J. W., Lorenz, W., Szkl, P. J., Fremeau, R.T. Jr., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. y Cotecchia, S. (1990) *Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype*. J. Biol. Chem. 265:8183-8189.
64. Schwinn, D. A. y Lomasney, J. W. (1992) *Pharmacology characterization of cloned α 1- adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggest the existence of a fourth subtypes*. Eur. J. Pharmacol. 227:433-436.
65. Wu, D., Katz, A., Lee, Ch-H. y Simon, M. Y. (1992) *Activation of phospholipase C by α 1-adrenergic receptors is mediated by the α subunits of Gq family*. J. Biol. Chem. 267:25798-25802.
66. Wu, D., Jiang, H. y Simon, M. Y. (1995) *Different α 1-adrenergic receptors sequences required for activating different G α subunits of Gq class of G proteins*. J. Biol. Chem. 270:9828-9832.
67. Kenny, B. A., Naylor, A. M., Greengrass, P.M., Russell, M. T., Friend, S. T., Read, A. M. y Wyllie, M. G. (1994) *Pharmacology properties of the cloned α 1a/d-adrenoceptor subtype are consistent with the α 1a-adrenoceptor characterized in rat cerebral cortex and vas deferens*. Br. J. Pharmacol. 111: 1003-1008.
68. Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J. y Piascik, M. T. (1996) *alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling*. Circ. Res. 78(5):737-749.
69. Xu X, Croy JT, Zeng W, Zhao L, Davignon I, Popov S, Yu K, Jiang H, Offermanns S, Muallem S, Wilkie TM (1998) *Promiscuous coupling of receptors to Gq class alpha subunits and effector proteins in pancreatic and submandibular gland cells*. J. Biol. Chem. 273:27275-27279.
70. Diviani, D., Lattion, A-L. y Cotecchia, S. (1997) *Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α 1B-adrenergic receptor*. J. Biol. Chem. 272:28712-28719.
71. Berridge, M. (1993) *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature. 361: 315-325.
72. Wang, H. J., Guay, G., Pogan, L., Sauve, R. y Nabi, I. R. (2000) *Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum*. J. Cell. Biol. 150(6):1489-1498.
73. García-Sáinz, J. A., Alcántara-Hernández, R. y Vázquez-Prado, J. (1997) *α 1-adrenoceptor subtype activation increases proto-oncogene mRNA levels. Role of protein kinase C*. Eur. J. Pharmacol. 342:311-317.
74. Keffel, S., Alexandrov, A., Goepel, M. y Michel, M. C. (2000) *α 1-adrenoceptor subtypes differentially couple to growth promotion and inhibition in chinese hamster ovary cells* Biochem. Biophys. Res. Commun. 272:906-911.
75. Nguyen, V-A. T. y Gao, B. (1999) *Cross-talk between α 1B-adrenergic receptor (α 1B-AR) and interleukin-6 (IL-6) signaling pathways*. J. Biol. Chem. 274:35492-35498.
76. Vázquez-Prado, J., y García-Sáinz, J. A. (1997) *Activation of endothelin ET_A receptors induces phosphorylation of α 1b-adrenoceptors in Rat-1 fibroblasts*. J. Biol. Chem. 272:27330-27337.

77. Casas-González, P., Vázquez-Prado, J. y García-Sáinz, J. A. (2000) Lysophosphatidic acid modulates α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation and function: roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* 57:1027-1033.
78. Medina, L. C., Vázquez-Prado, J. y García-Sáinz, J. A. (2000) Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and α_{1b} -adrenoceptors. *Biochem. J.* 350:413-419.
79. Corvera, S. y García-Sáinz, J. A. (1984) Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic regulation of hepatocytes metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:1128-1133.
80. Corvera, S., Schwarz, K. R., Graham, R. M. y García-Sáinz, J. A. (1986) Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic effects and decreases the affinity of liver α_1 -adrenergic receptors by epinephrine. *J. Biol. Chem.* 261:520-526.
81. Cowlen, M. S. y Toews M. L. (1988) Evidence for alpha₁-adrenergic receptor internalization in DDT₁ MF-2 cells following exposure to agonists plus protein kinase C activators. *Mol. Pharmacol.* 342:340-346.
82. Mccune, D. F., Edelmann, S. E., Olges, J. R., Post, G. R., Waldrop, B. A., Waugh, J. J. , Perez, D. M. y Piascik, M. T. (2000) Regulation of the cellular localization and signaling properties of the α_{1B} - and α_{1D} - adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol. Pharmacol.* 57:659-666.
83. Lin, F., Wang, H-Y. y Malbon, C. C. (2000) Gravin-mediated formation of signaling complexes in β_2 -adrenergic receptor desensitization and resensitization. *J. Biol. Chem.* 275:19025-19034.
84. Vázquez-Prado, J., Medina, L. C., Romero-Avila, M. T., Espinosa-González, C. y García-Sáinz, J. A. (2000) Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of α_{1a} -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 275:6553-6559.
85. García-Sáinz, J. A., Vázquez-Cuevas, F. y Romero-Avila, M. T. (2000) Phosphorylation and desensitization of α_{1d} -adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.*, en prensa.
86. Doronin, S., Lin, F., Wang, H. y Malbon, C. C. (2000) The full-length, cytoplasmic C- terminus of the beta2-adrenergic receptor expressed in *E. coli* acts as a substrate for phosphorylation by protein kinase A, insulin receptor tyrosine kinase, GRK2, but not protein kinase C and supresses desensitization when expressed in vivo. *Protein Expr. Purif.* 20(33):451-461.
87. McDonald, T. P., Dinnis, D. M., Marrison, C. F. y Harmar, A. J. (1998) Desensitization of the human vasoactive intestinal peptide receptor (hVIP2/PACAP R): evidence for agonist-induced receptor phosphorylation and internalization. *Ann. N Y Acad. Sci.* 865:64-72.
88. Innamorati, G., Le Gouill, C., Balamotis, M. y Birnbaumer, M. (2001) The long and short cycle: alternative intracellular routes for G-protein coupled receptors trafficking. *J. Biol. Chem*, en prensa.
89. Spurney, R.F. (1998) Role of C-terminal serines in desensitization and phosphorylation of the mouse thromboxane receptor. *J Biol. Chem.* 273:28496-28503.
90. Li, S., Liu, X., Min, L. y Ascoli, M. (2000) Mutation of the second extracellular loop of the human lutropin receptor emphasize the importance of receptor

- activation and de-emphasize the importance of receptor phosphorylation in agonist-induced internalization. *J. Biol. Chem.*, en prensa.
91. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S. y Caron, M. G. (2000) The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 275:23120-23126.
92. Maudsley, S., Pierce, K. L., Zamah, A. M., Miller, W. E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J. y Luttrell, L. M. (2000) The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 275:9572-9580.
93. Shih, M., Lin, F., Scott, J. D., Wang, H. Y. y Malbon, C. C. (1999) Dynamic complexes of beta2-adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J. Biol. Chem.* 274:1588-1595.
94. Sasaguri, T., Teruya, H., Ishida, A., Abumiya, T., Ogata, J. (2000) Linkage between alpha(1) adrenergic receptor and the Jak/STAT signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268(1):25-30.
95. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M. y Bovier, M. (2000) Detection of β_2 -adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(7):3684-3689.
96. Matsuo, R., Ochiai, W., Nakashima, K. y Taga, T. (2001) A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J. Immunol. Methods.* 247(1-2):141-151.
97. Cleem, D. L., sherman, L., Boonyaratanakornkit, V., Schrader, W. T., Weigel, N. L. y Edwards, D. P. (2000) differential hormone-dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol.* 14(1):52-65.

Protein phosphatase-protein kinase interplay modulates α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation: effects of okadaic acid

Rocío Alcántara-Hernández,¹ José Vázquez-Prado & *J. Adolfo García-Sáinz

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. postal 70-248; México D. F. 04510

1 In the present work we studied the effect of protein phosphatase inhibitors on the phosphorylation state and function of α_{1b} -adrenoceptors.

2 Okadaic acid increased receptor phosphorylation in a time- and concentration-dependent fashion (maximum at 30 min, EC₅₀ of 30 nM). Other inhibitors of protein phosphatases (calyculin A, tautomycin and cypermethrin) mimicked this effect.

3 Staurosporine and Ro 31-8220, inhibitors of protein kinase C, blocked the effect of okadaic acid on receptor phosphorylation. Neither genistein nor wortmannin altered the effect of okadaic acid.

4 The intense adrenoceptor phosphorylation induced by okadaic acid altered the adrenoceptor-G protein coupling, as evidenced by a small decreased noradrenaline-stimulated [³⁵S]GTPγS binding. Okadaic acid did not alter the noradrenaline-stimulated increases in intracellular calcium or the production of inositol trisphosphate.

5 Our data indicate that inhibition of protein phosphatases increases the phosphorylation state of α_{1b} -adrenoceptors, this effect seems to involve protein kinase C. In spite of inducing an intense receptor phosphorylation, okadaic acid alters α_{1b} -adrenergic actions to a much lesser extent than the direct activation of protein kinase C by phorbol myristate acetate.

British Journal of Pharmacology (2000) 129, 724–730

Keywords: α_1 -Adrenoceptors, α_1 -adrenergic receptors, phosphorylation, desensitization

Abbreviations: α_1 -AR, α_1 -adrenoceptor; [Ca²⁺]_i, intracellular calcium; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GRK, G-protein receptor kinase; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

Introduction

The α_1 -adrenoceptors (α_1 -ARs) are a heterogeneous subgroup of receptors, members of the seven transmembrane domains, G protein-coupled family of receptors that mediate important physiological actions of adrenaline and noradrenaline. Three α_1 -ARs have been cloned and expressed (i.e. the α_{1a} , α_{1b} and α_{1c} -ARs (Hieble *et al.* 1995). The hamster α_{1b} subtype was the first to be cloned (Cotecchia *et al.* 1988), it is the best characterized and, therefore considered prototypic of this subgroup. These receptors are mainly coupled to the phosphoinositide calcium mobilization signal transduction pathway although they can also activate other signalling processes (Graham *et al.* 1996).

Modulation of G protein coupled receptor function (desensitization/resensitization) is a key event in the adaptation of cells to the changes in the internal milieu of an organism and to the overall homeostasis. Different cellular processes are involved (receptor uncoupling from G proteins, internalization, degradation, regulation of receptor gene expression, etc.) with different time frames (Lefkowitz 1998). An initial event seems to be receptor phosphorylation. Three groups of protein kinases are the major modulators of G protein-coupled receptors: (a) second messenger-activated kinases such as protein kinase A and protein kinase C (PKC) (Clark *et al.* 1988; Houslay 1991); (b) members of the G-protein receptor kinase (GRK) family (Benovic *et al.* 1990) and (c) some receptors with tyrosine kinase activity (Haddock *et al.* 1992).

Regarding α_1 -ARs, it is known that activation of PKC blocks the actions of these receptors and that such effect is

associated to receptor phosphorylation (Corvera & García-Sáinz, 1984; Corvera *et al.* 1986; Diviani *et al.* 1996, 1997; Lattion *et al.* 1994; Leeb-Lundberg *et al.* 1985; Vázquez-Prado & García-Sáinz, 1996; Vázquez-Prado *et al.* 1997). Similarly, there is also evidence indicating that GRKs phosphorylate these receptors and participate in their homologous desensitization (Diviani *et al.* 1996). The PKC- and GRK-phosphorylation sites were recently identified at the α_{1b} -AR carboxyl terminus (Diviani *et al.* 1996, 1997).

The phosphorylation state of a receptor results from the balance of activities of protein kinases and protein phosphatases. In contrast to what is known about the roles of protein kinases on G protein coupled receptor phosphorylation, little is known about the role of protein phosphatases. In this regard, Pitcher *et al.* (1995) have shown that a latent oligomeric form of protein phosphatase 2A actively dephosphorylates the β_1 -AR *in vitro* and Shih *et al.* (1999) reported that protein phosphatase 2A and 2B are associated with β_2 -ARs. It has also been observed that okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases, induces both augmentation and inhibition of β_1 -AR-mediated stimulation of cyclic AMP accumulation (Clark *et al.* 1993). Inhibition of the serine/threonine protein phosphatase, calcineurin, enhances desensitization and phosphorylation of adipocyte β_1 -AR (Bahouth *et al.* 1996).

In the case of the α_{1b} -ARs there is no information available. Regulation of protein phosphatase activity is a potentially important point of regulation of receptor function. Low molecular weight protein phosphatase inhibitors that are able to penetrate living cells are important tools in the study of receptor function (Holmes & Boland 1993). Okadaic acid, tautomycin and calyculin A are selective inhibitors *in vitro* for the catalytic subunits of protein phosphatase 1 and protein

*A. Alcántara-Hernández

phosphatase 2A (Holmes & Boland, 1993) whereas cypermethrin is specific, *in vitro*, for protein phosphatase 2B (Wang & Steizer, 1994). In the present work we explore the roles of protein phosphatases on receptor phosphorylation and function by the use of inhibitors.

Methods

Cell line and culture

Rat-1 fibroblasts transfected with the hamster α_2 -AR (Cotecchia *et al.*, 1988), generously provided to us by Drs R. J. Lefkowitz, M. G. Caron and L. Allen (Duke University), were cultured as described previously (Vázquez-Prado & García-Sanz, 1996; Vázquez-Prado *et al.*, 1997). In the present experiments, cells at confluence were serum-deprived in unsupplemented Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) for 18–24 h.

Receptor phosphorylation

Experiments were performed as described in detail (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). In brief, cells were maintained in phosphate-free DMEM during 1 h and then incubated in 3 ml of the same medium containing [32 P]Pi (50 μ Ci ml $^{-1}$) for 3 h at 37°C. Labelled cells were stimulated as indicated, then they were washed and solubilized with 1 ml of ice-cold solubilization buffer containing 1% Triton X-100 and 0.05% sodium dodecyl sulphate (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). The extracts were centrifuged and the supernatants transferred to tubes containing a rabbit antiserum generated against the carboxyl terminus decapeptide of the hamster α_2 -AR and sepharose-coupled protein A and immunoprecipitated (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). The immunoprecipitates were subjected to electrophoresis and phosphorylated receptor was determined by PhosphorImager analysis.

Intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$)

Determinations were as reported previously (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). Briefly, cells were incubated overnight in G418-free DMEM without serum, loaded with 5 μ M Fura-2 AM at 37°C for 1 h, detached and washed. Cells were resuspended at a concentration of approximately 10^6 cells ml $^{-1}$ in Krebs-Ringer-HEPES, pH 7.4, containing 0.05% bovine serum albumin. When okadaic acid or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were used, the cells were in contact with these agents for 15 min and remained present during the assay. Fluorescence measurements were performed in an AMINCO-Bowman spectrofluorometer with excitation monochromator set at 340 and 380 nm, with a chopper interval of 0.5 s, and the emission monochromator set at 510 nm. The $[Ca^{2+}]_i$ was calculated according to Grynkiewicz *et al.* (1985) using the software provided by AMINCO-Bowman. Traces were directly exported to the graphs.

[3 H]inositol triphosphate production

Determinations were as previously reported (Vázquez-Prado & García-Sanz, 1996) with minor modifications. In brief, cells were labelled with [3 H]inositol (6 μ Ci ml $^{-1}$) for 18–24 h in niositol free DMEM. On the day of the experiment, cells were washed twice with Krebs-Ringer HEPES buffer containing 1.5 mM CaCl $_2$ and preincubated for 30 min in 2 ml of the same buffer containing 10 mM LiCl. When okadaic acid or PMA

were used they were added during this preincubation and remained present during the assay. Incubations continued a further 15 min (in the absence or presence of noradrenaline) and were terminated by the addition of ice-cold perchloric acid. Supernatants were neutralized and [3 H]inositol triphosphate was separated by Dowex AG1-X8 chromatography (Berridge *et al.*, 1983).

Membrane preparation and [32 S]GTP γ S binding

Confluent cells were incubated in the absence (control) or presence of noradrenaline (10 μ M) for 5 min or with PMA (1 μ M), okadaic acid (1 μ M) or okadaic acid (1 μ M) plus PMA (1 μ M) for 15 min at 37°C. Washing with ice-cold phosphate buffered saline terminated the reaction and cells were scraped with 1 ml of ice-cold buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 100 μ M Na $_2$ VO $_4$, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, plus protease inhibitors) (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). Membranes were prepared according to the method of Mattingly *et al.* (1992). [32 S]GTP γ S binding was performed as described by Wieland & Jakobs (1994) with minor modifications. Briefly, membranes were resuspended in binding buffer (in mM): Tris 50, MgCl $_2$ 10, EDTA 1, NaCl 100, DTT 1, pH 7.4, 1 μ M GDP, 0.1% bovine serum albumin. Binding was performed at 25°C for 30 min in a volume of 250 μ l of binding buffer containing 0.2 nM [32 S]GTP γ S. Membranes were stimulated with 10 μ M noradrenaline. The reaction was initiated by the addition of membranes (25 μ g of protein/tube) and terminated by rapid filtration through Whatman GF/C filters followed by three washes of the filters with ice-cold buffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl $_2$, pH 7.5). The filters were dried and the radioactivity was quantified by liquid scintillation. Nonspecific binding was determined in the presence of unlabelled GTP γ S (30 μ M) and represented 10% of total binding.

Statistical analysis between comparable groups was performed using analysis of variance with Newman-Keuls post test.

Materials

(-)-Noradrenaline, PMA, dl-propranolol, staurosporine, bovine serum albumin, wortmannin and protease inhibitors were obtained from Sigma Chemical Co. Genistein were from Research Biochemicals Inc. DMEM, foetal bovine serum, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from Gibco BRL. Okadaic acid, cypermethrin, tautomycin, calyculin A and Ro 31-8220 were from Calbiochem (2,3- 3 H]mvo-inositol (22.9 Ci mmol $^{-1}$), [32 S]GTP γ S (1250 Ci mmol $^{-1}$) and [32 P]Pi (8500–9120 Ci mmol $^{-1}$) were from New England Nuclear. Sepharose-coupled protein A was from Upstate Biotechnology. Fura-2 AM was from Molecular Probes.

Results

The effect of okadaic acid on α_2 -AR phosphorylation was studied. As shown in Figure 1 (left panel), okadaic acid (1 μ M) increased the phosphorylation of α_2 -ARs. A clear increase was evident as early as 5 min after the addition of the protein phosphatase inhibitor and the effect reached its maximum (~ 2.5 fold) at 30 min, this effect remained constant up to 60 min. The effect of okadaic acid was concentration-dependent with an EC $_{50}$ of 90 nM (Figure 1, right panel). The effect of okadaic acid on α_2 -AR phosphorylation ($P < 0.001$) vs

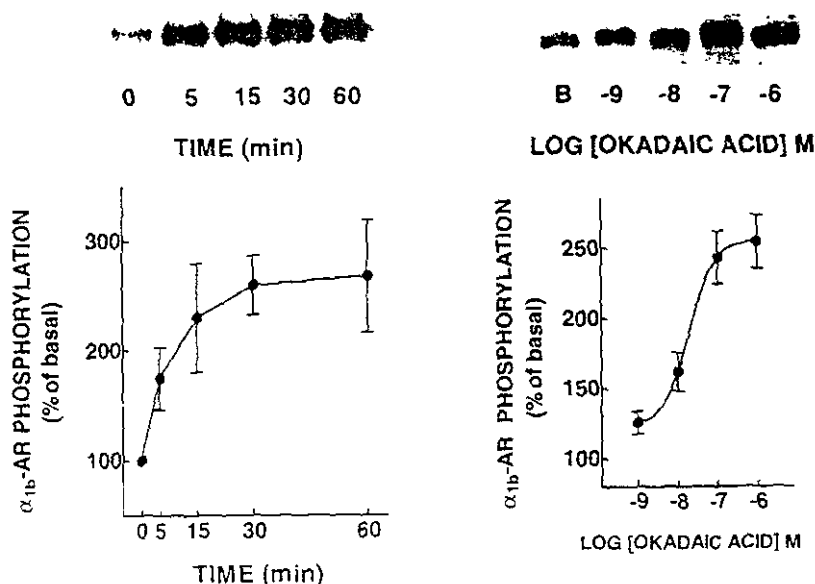


Figure 1 Effects of okadaic acid on α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation. Left panel: cells were incubated with 1 μ M okadaic acid for the times indicated. Right panel: cells were incubated with the indicated concentrations of okadaic acid for 30 min. Plotted are the means and vertical lines represent the SEMs of three determinations using different cell preparations. Representative autoradiographs are shown in B. basal phosphorylation.

control) was comparable in magnitude to that induced by 1 μ M PMX (280 \pm 40% of basal, $P < 10^{-7}$). Other protein phosphatase inhibitors were tested at a concentration of 1 μ M and the effect is shown in Figure 2. Enzymicin ($P < 0.001$ vs control), calyculin A ($P < 0.001$ vs control) and to a lesser extent, spermythrin ($P < 0.05$ vs control) increased α_{1b} -AR phosphorylation.

The data indicated that when protein phosphatases were inhibited the phosphorylated receptor accumulated. In order to gain insight into the protein kinases involved in this effect the effect of protein kinase inhibitors was tested. As shown in Figure 3, staurosporine (10 μ M), an inhibitor of protein serine/threonine kinases with relative selectivity for PKC, decreased basal receptor labelling and blocked the effect of okadaic acid ($P < 0.001$ vs okadaic acid alone). In contrast, calyculin (10 μ M), a protein tyrosine kinase inhibitor, blocked neither the basal labelling nor the effect of okadaic acid on the state of phosphorylation of the receptor. The effect of wortmannin (10 μ M), an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, was also tested; this inhibitor affected neither the basal phosphorylation of the α_{1b} -AR nor the effect of okadaic acid. In order to define more clearly the effect of PKC, the effects of staurosporine and of the selective PKC inhibitor, Ro 31822, were studied in more detail. The inhibitors decreased the basal phosphorylation of the receptor in concentrations of 1 μ M and higher ($P < 0.001$ in all cases), in a concentration-dependent manner, the effect of okadaic acid (Figure 4). As shown in staurosporine was a 0.5×10^{-6} M concentration (IC_{50}) and that of Ro 31822, 1 μ M.

In a similar previously study with PMX, α_{1b} -adrenoceptor and α_{1b} -adrenoceptor mRNA levels were studied by Northern blotting (Alcántara-Hernández et al., 1994; Alcántara-Hernández et al., 1995; Alcántara-Hernández et al., 1997). The possibility of the action of

okadaic acid could be additive to that of the previously mentioned agents was examined. However, we were unable to observe any clear additivity (data not shown).

We next examined the functional relevance of the effect of okadaic acid on the α_{1b} -AR phosphorylation state. Two parameters were examined: [Ca^{2+}]_i and [3H]inositol trisphosphate production. In these experiments okadaic acid and/or PMX were preincubated with the cells for 15 min ([Ca^{2+}]_i) or 30 min ([3H]inositol trisphosphate production) before noradrenaline (in the presence of 10 μ M propranolol to block any β -adrenergic action) was added. It can be observed in Figure 5 (upper panel) that noradrenaline induced a concentration-dependent increase in [Ca^{2+}]_i. Okadaic acid by itself did not alter basal [Ca^{2+}]_i and it did not alter in any significant way the effect of different concentrations of noradrenaline. In contrast, preincubation with PMX markedly decreased the effect of noradrenaline ($P < 0.001$ vs control) at noradrenaline concentrations of 100 nM and above. When the cells were preincubated with okadaic acid and PMX no effect of noradrenaline on [Ca^{2+}]_i was observed at all (Figure 5, upper panel) ($P > 0.05$ vs PMX alone at noradrenaline concentrations of 1 and 10 μ M; $P < 0.001$ vs control at noradrenaline concentrations of 100 nM and above).

Similarly, noradrenaline (in the presence of 10 μ M propranolol) induced a marked increase in the production of [3H]inositol trisphosphate from [3H]inositol-labelled cells (Figure 5, lower panel) ($P < 0.001$ vs control). Okadaic acid (Figure 5, lower panel) and PMX (not shown) by themselves did not alter the basal production of this second messenger. PMX ($P < 0.01$ vs control) but not okadaic acid (it blocked the effect of noradrenaline) (Figure 5, lower panel). When the cells were preincubated with PMX, the addition of

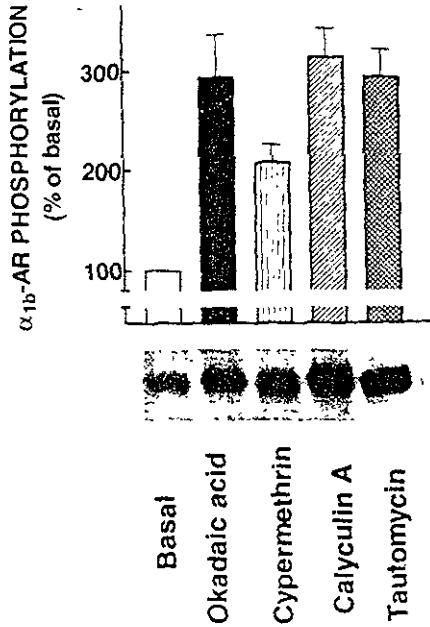


Figure 2 Effects of protein phosphatase inhibitors on α_2 -adrenoceptor phosphorylation. Cells were incubated in the absence of any inhibitor. Basal or in the presence of 1 μ M of the indicated inhibitors for 70 min. Plotted are the means and vertical lines represent the s.e.m. of four determinations using different cell preparations. A representative autoradiograph is shown.

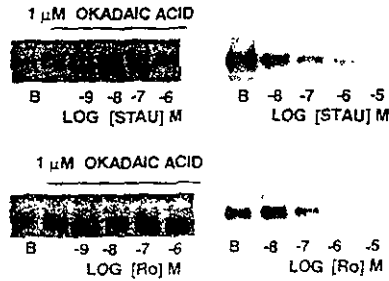
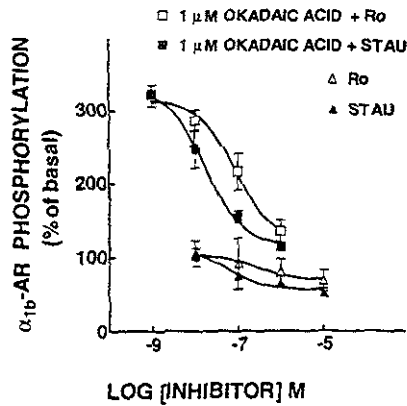


Figure 4 Effects of protein kinase C inhibitors on basal and okadaic acid induced α_2 -adrenoceptor (α_2 -AR) phosphorylation. Cells were incubated in the absence of presence of 1 μ M okadaic acid and different concentrations of staurosporine (STAU) or Ro-31-8220 (Ro). B: basal phosphorylation. Plotted are the means and vertical lines represent the s.e.m. of 3-4 determinations using different cell preparations. Representative autoradiographs are shown.

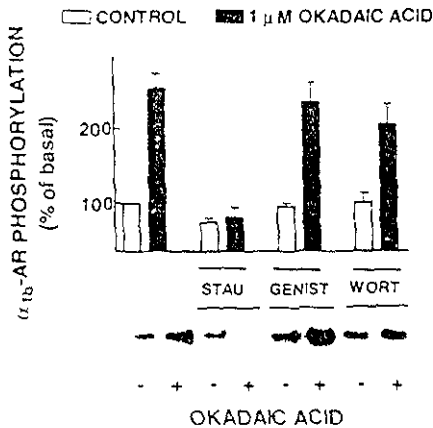


Figure 5 Effect of cyclic inhibitors on the effect of okadaic acid on α_2 -adrenoceptor phosphorylation. Cells were incubated in the absence of presence of 1 μ M okadaic acid and the inhibitors of adenylyl cyclase (STAU), phospholipase C (GENIST) or protein kinase C (WORT) for 70 min. Plotted are the means and vertical lines represent the s.e.m. of 3-4 determinations using different cell preparations. A representative autoradiograph is shown.

okadaic acid only slightly further decreased the α_2 -adrenergic effect but did not block it; this further decrease was not statistically significant (Figure 2, lower panel).

In order to study more directly the effect of the different treatments on α_2 -AR-G protein coupling noradrenaline-stimulated [³S]GTP γ S binding was studied. It can be observed in Figure 6 that noradrenaline increased the guanine nucleotide binding to membranes of control cells; such increase was of smaller magnitude in membranes obtained from cells incubated with 10 μ M noradrenaline ($P < 0.001$ vs control), or 1 μ M PMX ($P < 0.001$ vs control). Okadaic acid induced a small but statistically significant ($P < 0.05$ vs control) decrease in agonist-stimulated binding. In membranes from cells incubated in the presence of PMX and okadaic acid, the decrease in agonist-stimulated guanine nucleotide binding was bigger than that observed with okadaic acid alone ($P < 0.001$) but similar to that observed with PMX alone (Figure 6).

Discussion

Our present data clearly indicate that inhibition of serine/threonine protein phosphatases markedly increases the

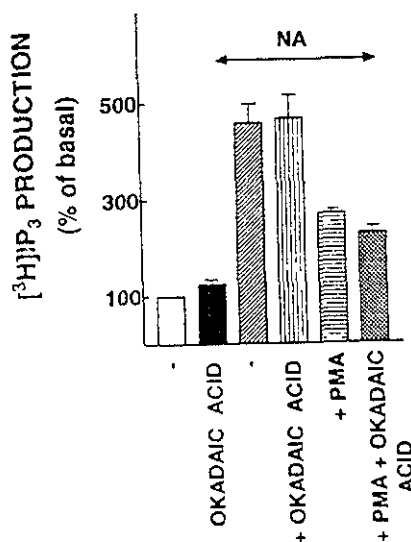
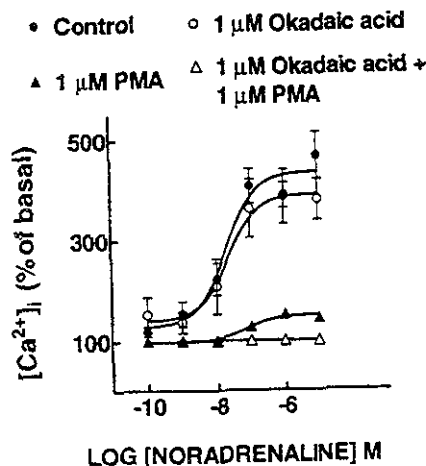


Figure 5 Functional consequences of the effects of okadaic acid and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on α_2 -adrenergic action. Upper panel: $[Ca^{2+}]_i$ concentration-response curves to noradrenaline of cells preincubated in the absence of any agent (Control), 1 μ M okadaic acid, 1 μ M PMA or 1 μ M PMA plus 1 μ M okadaic acid. Lower panel: $[^3H]IP_3$. Cells were preincubated without any agent or with 1 μ M of the agents indicated under the bars. After this preincubation the cells were further incubated for 15 min in the presence or presence of 10 μ M noradrenaline plus 10 μ M propranolol (NA). Plotted are the means and vertical lines represent the s.e.mean of 6–7 determinations using different cell preparations.

phosphorylation state of the α_2 -AR. To the best of our knowledge this is the first demonstration of such an effect for α_2 -AR.

Another mechanism could be an increase in the basal activity of protein phosphatases. This possibility is

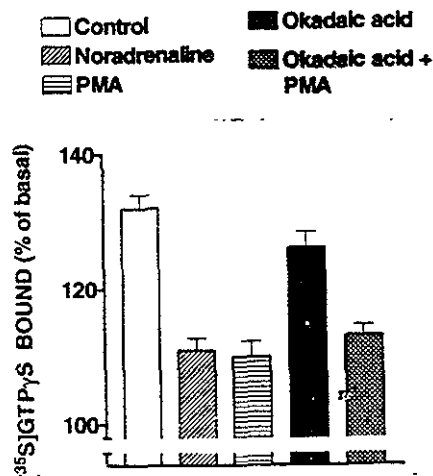


Figure 6 Effect of cell treatment with noradrenaline, okadaic acid and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on noradrenaline-stimulated $[^{35}S]GTP\gamma S$ binding. Cells were incubated in the absence of any agent (Control) or presence of 10 μ M noradrenaline, 1 μ M PMA, 1 μ M okadaic acid or 1 μ M okadaic acid plus 1 μ M PMA. Membranes were stimulated with 10 μ M noradrenaline. Plotted are the means and vertical lines represent the s.e.mean of 18–25 determinations using six different membrane preparations, for each condition.

phosphorylation of G protein coupled receptors has been gained, but there is very little information on the roles of protein phosphatases. Nevertheless, it has been observed that peroxovanadate enhances desensitization and phosphorylation of adipocyte β_2 -AR by inhibiting the activity of the serine/threonine protein phosphatase, calcineurin (Bahouth *et al.*, 1996). A latent oligomeric form of protein phosphatase 2A has been shown to actively dephosphorylate the β_2 -AR *in vitro* (Pitcher *et al.*, 1995).

Current evidence suggest that scaffold, anchoring and adapter proteins contribute to the specificity of signal transduction by recruiting active enzymes into signalling complexes (Pawson & Scott, 1997). This has been extensively observed in tyrosine kinase receptor signalling (Pawson & Scott, 1997) and was very elegantly extended for G protein coupled receptors by Shih *et al.* (1999). Very recently, these authors reported that protein phosphatase 2A and 2B are associated with β_2 -ARs in the basal state and that the latter protein phosphatase and PKA display a robust association with these receptors following challenge with the agonists. The anchoring protein gravin participates in the formation of these dynamic complexes with protein kinases, protein phosphatases and the β_2 -AR (Shih *et al.*, 1999).

A complex interplay seems to exist between PKC and protein phosphatases to modulate α_2 -AR phosphorylation and function. Our studies with protein phosphatase inhibitors suggest that protein phosphatases-1, 2A and 2B could be involved in modulating receptor phosphorylation. However, although these inhibitors show selectivity *in vitro*, their selectivity *in vivo* is questionable. Therefore, we cannot define the types of protein phosphatase(s) involved.

It is possible that basal PKC activity was sufficient to phosphorylate α_2 -ARs. This is supported by the observation

that PKC inhibitors decreased basal phosphorylation at concentrations above 1 μ M. The marked increase in α_1 -AR phosphorylation in the presence of okadaic acid suggests that protein phosphatase activity exert a tonic action dephosphorylating these adrenoceptors. Alternatively, it is possible that inhibition of protein phosphatases may activate PKC; in fact, there is evidence that protein phosphatases reversibly inhibit PKC activity *in vitro* (Ricciardi & Azzi, 1998). The present data do not allow us to distinguish between these not mutually exclusive possibilities.

A particularly interesting finding was that despite the fact that okadaic acid increased α_1 -AR phosphorylation, neither the $[Ca^{2+}]_i$ increase nor the production of $[^3H]$ inositol triphosphate induced by noradrenaline were significantly altered. This is in marked contrast with the results obtained with PMA, which greatly reduced both receptor responses. We have previously observed that bradykinin induced α_1 -AR phosphorylation without leading to adrenoceptor desensitization (Medina *et al.*, 1998); however, bradykinin induced only a 50% increase in receptor phosphorylation. Okadaic acid induced an increase in α_1 -AR phosphorylation of similar magnitude as PMA but the functional repercussions markedly differ.

The results on noradrenaline-stimulated $[^3S]GTP\gamma S$ binding indicate that the phosphorylation induced by the treatment with okadaic acid does indeed impair the adrenoceptor-G protein coupling, but to a much lesser extent than PMA or noradrenaline. Such okadaic acid-induced decrease of receptor-G protein coupling does not however seem to affect the adrenergic actions in whole cells, i.e. the intracellular calcium and inositol triphosphate responses were not decreased.

The differences in the effect of PMA and okadaic acid on the receptor response may also reflect the fact that in addition to receptor phosphorylation other event may underlie

desensitization. Among these, PKC-dependent phosphorylation of other molecular entities participating in signalling, such as G protein(s) or phospholipase C might result in desensitization.

The actions of both PMA and okadaic acid on α_1 -AR phosphorylation seem to involve PKC activity, but they had very different functional repercussions. This suggests that differences may exist in the sites phosphorylated under the action of PMA or okadaic acid. One possibility that may explain this puzzle is that PMA may activate PKC isoforms that are not active in the basal state or in the presence of okadaic acid. PKC is a multigene family of protein kinase with different sensitivity to activators and substrate selectivity (Newton, 1995). There is no data on the isoforms of PKC that participate in α_1 -AR phosphorylation.

As indicated, the sites involved in PKC-mediated α_1 -AR phosphorylation have been identified in the carboxyl terminus (Ser³⁹⁴ and Ser⁴⁰⁰) although a third, yet unidentified, site seems to exist (Diviani *et al.*, 1997). The sites where basal phosphorylation takes place and the kinase(s) involved have not yet been positively identified. The functional significance of such basal phosphorylation is unknown.

In summary, our data indicate that inhibition of protein phosphatases increase α_1 -AR phosphorylation. This effect seems to involve PKC activity. In contrast to the effect of PMA, okadaic acid does not block α_1 -adrenergic actions in whole cells and only marginally affect receptor coupling to G proteins as evidenced by the noradrenaline-stimulated $[^3S]GTP\gamma S$ binding.

This research was partially supported by Grants from DGAPA (IN 200596 and IN 205199), CONACyT (27569-N) and Fundacion Miguel Aleman

References

- BAHOUTH SW, GOKMEN-POLAR Y, CORONFI EC & FAIN JN (1996). Enhanced desensitization and phosphorylation of the β_1 -adrenergic receptor in rat adipocyte by peroxovanadate. *Mol Pharmacol*, **49**, 1049-1057.
- BENOVIC JL, DEPLASI A, STONE WC, CARON MG & LEFKOWITZ RJ (1990). β -Adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science*, **246**, 235-240.
- BERRIDGE MJ, DOWNSON RMC, DOWNES P, HESLOP JP & IRVINE RF (1983). Changes in the level of inositol phosphates after isoprost- dependent hydrolysis of membrane phospholipids. *Biochem J*, **212**, 473-482.
- CLARK RB, FRIEDMAN J, KUNKEI MW, JANUARY BG & SHENOIKAR S (1993). Okadaic acid induces both augmentation and inhibition of β -adrenergic stimulation of cAMP accumulation in S49 lymphoma cells. *J Biol Chem*, **268**, 3245-3250.
- CLARK RB, KUNKEI MW, FRIEDMAN J, GOKA TJ & JOHNSON JA (1988). Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 1442-1446.
- CORVERA S & GARCIA-SAINZ JA (1984). Phorbol esters inhibit α_1 adrenergic regulation of hepatoxide metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*, **119**, 1125-1133.
- CORVERA S, SCHWARZ KR, GRAHAM RM & GARCIA-SAINZ JA (1986). Phorbol esters inhibit α_1 adrenergic effects and decreases the affinity of liver α_1 adrenergic receptors for epinephrine. *J Biol Chem*, **261**, 520-526.
- COLLICHUX S, SCHWANN DA, RYNDAL RR, LEFKOWITZ RJ, CARON MG & KOHLHA BK (1988). Molecular cloning and expression of the cDNA for the human α_1 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 7159-7163.
- DIVIANI D, LATTION A-L & COTECCHIA S (1997). Characterization of the phosphorylation site involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase-C-mediated desensitization of the α_1 -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **272**, 28712-28719.
- DIVIANI D, LATTION A-L, LARBI Y, KUNAPULI P, PRONIN A, BENOVIC JL & COTECCHIA S (1996). Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_1 -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **271**, 5049-5058.
- GRAHAM RM, PEREZ DM, HWA J & PIASCK MT (1996). α_1 -Adrenergic receptor subtypes: Molecular structure, function and signaling. *Circ Res*, **78**, 737-749.
- GRYNKIEWICZ G, POENIE M & TSIEN RY (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
- HADCOCK JR, PORT JD, GELMAN MS & MALBON CC (1992). Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of β -adrenergic receptors in response to insulin. *J Biol Chem*, **267**, 26017-26022.
- HIEBLE JP, BYLUND, DB, CLARKE DE, EIKENBURG, DC, LUNGER SZ, LEFKOWITZ, RJ, MINNEMAN K P & RUFFOLO, JR RR (1995). International Union of Pharmacology X. Recommendations for nomenclature of α_1 -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev*, **47**, 267-270.
- HOLMES CB & BOLAND MP (1993). Inhibitors of protein phosphatase 1 and -2A, two of the major serine/threonine protein phosphatases involved in cellular regulation. *Curr Opin Struct Biol*, **3**, 934-945.
- HOLMAY MD (1991). Cross-talk: a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur J Biochem*, **195**, 9-27.

- LATTION, A.-L., DIVIANI, D. & COTECCHIA, S. (1994). Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22887–22893.
- LEEB-LUNDBERG, L.M.F., COTECCHIA, S., LOMASNEY, J.W., DEBERNARDIS, J.F., LEFKOWITZ, R.J. & CARON, M.G. (1985). Phorbol esters promote α_1 -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 5651–5655.
- LEFKOWITZ, R.J. (1998). G protein-coupled receptors III. New Roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18677–18680.
- MATTINGLY, R.R., WASILENKO, W.J., WOODRING, P.J. & GARRISON, J.C. (1992). Selective amplification of endothelin-stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium signaling by *v-src* transformation in rat-1 fibroblast. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7470–7477.
- MEDINA, L.C., VAZQUEZ-PRADO, J., TORRES-PADILLA, M.E., MENDOZA-MENDOZA, A., CRUZ-MUNOZ, M.E. & GARCÍA-SÁINZ, J.A. (1998). Crosstalk: phosphorylation of α_{1B} -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett.*, **422**, 141–145.
- NEWTON, A.C. (1995). Protein kinase C, structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28495–28498.
- PAWSON, T. & SCOTT, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science*, **278**, 2075–2080.
- PITCHER, J.A., PAYNE, E.S., CSORTOS, C., DEPAOLI-ROACH, A. & LEFKOWITZ, R.J. (1995). The G-protein-coupled receptor phosphatase, a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 8343–8347.
- RICCIARELLI, R. & AZZI, A. (1998). Regulation of recombinant PKC α activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A. *Arch. Biochem. Biophys.*, **355**, 197–200.
- SHIH, M., LIN, F., SCOTT, J.D., WANG, H.-Y. & MALBON, C.C. (1999). Dynamic complexes of β_2 -adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1588–1595.
- VAZQUEZ-PRADO, J. & GARCÍA-SÁINZ, J.A. (1996). Effect of phorbol myristate acetate on α_1 -adrenergic action in cells expressing recombinant α_1 -adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.*, **50**, 17–22.
- VAZQUEZ-PRADO, J., MEDINA, L.C. & GARCÍA-SÁINZ, J.A. (1997). Activation of endothelin ET $_A$ receptors induce phosphorylation of α_{1B} -adrenoceptors in rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27330–27337.
- WANG, J.H. & STELZER, A. (1994). Inhibition of phosphatase 2B prevents expression of hippocampal long-term potentiation. *Neuroreport*, **5**, 2377–2380.
- WIELAND, T. & JAKOBS, K.H. (1994). Measurements of receptor-stimulated guanosine 5'-O-(gamma-thio)triphosphate binding by G proteins. In: Iyengar, R. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press: London, pp. 3–13.

(Received June 4, 1999)

Revised November 1, 1999

Accepted November 2, 1999

Protein kinase C - α_{1b} -adrenoceptor co-immunoprecipitation: effect of hormones and
phorbol myristate acetate

Rocío Alcántara-Hernández, Dinorah Leyva-Ileades and J. Adolfo García-Sáinz¹

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

¹To whom correspondence should be addressed:

J. Adolfo García-Sáinz

Inst. Fisiología Celular, UNAM

Ap. postal 70-248

México D. F. 04510

Tel (525) 622 5673

Fax (525) 622 5613

Email. agarcia@ifisiol.unam.mx

Abstract

α_{1b} -Adrenoceptors immunoprecipitated with protein kinase C α , δ , and ϵ isoforms under basal conditions and such co-immunoprecipitations were increased in cells treated with phorbol myristate acetate. The increased co-immunoprecipitations induced by phorbol myristate acetate were concentration-dependent and reached their maxima 1 to 2 min after the addition of the tumor promoter. No co-immunoprecipitation of protein kinase C ζ and α_{1b} -adrenoceptors was detected. Norepinephrine, endothelin-1, lysophosphatidic acid and epidermal growth factor were also able to increase the co-immunoprecipitation of protein kinase C isoenzymes and α_{1b} -adrenoceptors. These data support the idea that protein kinase-receptor complexes might form and could be relevant in receptor desensitization.

Keywords: α_1 -Adrenoceptors, protein kinase C, desensitization

1.- Introduction

Receptor phosphorylation seems to be a cardinal initial event in desensitization of G protein-coupled receptor signaling. Two major types of desensitizations exist: homologous and heterologous desensitizations. Homologous desensitization, in which receptors occupied by agonists reduce their responsiveness, mainly involves receptor phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases. Heterologous desensitization, in which the stimulation by an agent attenuates the response to an unrelated agonist, mainly involves phosphorylation of receptors and other signaling entities by second messenger-activated kinases, such as protein kinase A and protein kinase C (García-Sáinz et al. 2000). Current ideas indicate that protein kinases and phosphatases form dynamic complexes with substrates and anchoring proteins; such dynamic complexes are organized and coordinated through specific protein-protein and protein-phospholipid interactions and it is through these signaling networks that cellular responses are regulated (Pawson and Scott, 1997).

α_{1b} -Adrenoceptors are members of the superfamily of the seven transmembrane domains G-protein-coupled receptors. Agonist-induced phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors seems to be mediated by G protein-coupled receptor kinase 2 and 3 isoenzymes (Diviani et al., 1996; Iacovelli et al., 1999), whereas the phosphorylation of these adrenoceptors by protein kinase C mainly participates in heterologous desensitization (Diviani et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 1997; Casas-González et al., 2000; García-Sáinz et al., 2000; Medina et al., 2000).

Protein kinase C is a family of enzymes that have been divided into three structurally related groups, conventional (α , β I, β II and γ), novel (δ , ϵ , η , θ and μ) and

atypical (ζ and λ) isoenzymes, with different requirements for calcium and diacylglycerol (Newton, 1995). Although great progress has been achieved, it is yet far from clear what role(s) each isoenzyme plays and to what extent their functions overlap.

In the case of α_{1b} -adrenoceptors there is no information on the protein kinase C isoenzymes that participate in receptor phosphorylation and desensitization. We took advantage of the availability of antibodies that effectively immunoprecipitate α_{1b} -adrenoceptors (Vázquez-Prado et al., 1997) to define what protein kinase C isoenzymes co-immunoprecipitate with the adrenoceptor, under basal and stimulated conditions. Our data indicate that in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1b} -adrenoceptors, protein kinase C α , δ and ϵ isoforms co-immunoprecipitate with these adrenoceptors under basal conditions and that such a co-immunoprecipitation is increased by agents that induce receptor phosphorylation.

2.- Materials and Methods

2.1.- Materials. Dulbecco's modified Eagle's medium, EGF (epidermal growth factor), fetal bovine serum, protein kinase C isoenzyme-selective antibodies and others reagents used for cell culture were obtained from Gibco BRL. (-)-Noradrenaline, lysophosphatidic acid, endothelin-1, phorbol myristate acetate (PMA), phospho-amino acids and protease inhibitors were from Sigma Chemical Co. Sepharose-coupled protein A was from Upstate Biotechnology. Nitrocellulose membranes were from Bio-Rad. Secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology and the chemiluminescence kits were obtained from Pierce.

2.2.- *Cell line and culture.* Rat-1 fibroblasts transfected with the hamster α_{1b} -adrenoceptor, generously provided to us by Drs. R. J. Lefkowitz, M.G. Caron and L. Allen (Duke University), were cultured in glutamine-containing high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the neomycin analog, G-418 sulfate, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 100 U/ml penicillin and 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B at 37 °C under a 95 % air/5 % CO_2 atmosphere as described previously (Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). In all the experiments, confluent cells were serum-deprived overnight in unsupplemented Dulbecco's modified Eagle's medium.

2.3.- *α_{1b} -Adrenoceptor-protein kinase C co-immunoprecipitation studies.* α_{1b} -adrenoceptors were immunoprecipitated as described previously (Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000), with minor modifications. In brief, following treatment with inhibitors and/or agonists, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed for 1 h on ice in buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.05% sodium dodecyl sulfate, 50 mM NaF, 100 μM Na_3VO_4 , 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phosphoserine, 1 mM phosphothreonine and protease inhibitors (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bacitracin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soybean trypsin inhibitor). Cell lysates were centrifuged at 12,700 x g for 15 min and the supernatants were incubated overnight at 4°C with the anti- α_{1b} -adrenoceptor antiserum (Vázquez-Prado et al., 1997) and protein A-Sepharose. After four washes with 50 mM HEPES, 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.4, 0.1% Nonident P40, the immune complexes were denatured by boiling in sodium dodecyl sulfate-sample buffer

containing 5% β -mercaptoethanol, and subjected to 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes and immunoblotting was performed. Incubation with the protein kinase C isoenzyme-selective antibody was for 12 hs at 4 °C and with the secondary antibody for 3 hs at room temperature. Super signal enhanced chemiluminescence kits from Pierce were used exposing the membranes to X-Omat X-ray films. The level of receptor immunoprecipitated under these conditions was consistent as evidenced by immunoblotting (see figures) and represented 80-85% of total α_{1b} -adrenoceptors as evidenced by immunoprecipitation of photoaffinity-labeled receptor (Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000); protein kinase C co-immunoprecipitation was assessed by densitometric analysis.

3.- Results

As shown in Fig. 1 (upper panels), we were able to detect co-immunoprecipitation of α_{1b} -adrenoceptors with the α , δ , and ϵ isoforms of protein kinase C under basal conditions and such co-immunoprecipitations were increased in cells treated with PMA. The increased α_{1b} -adrenoceptor-protein kinase C co-immunoprecipitations induced by PMA reached their maxima 1 to 2 min after the addition of the tumor promoter and remained at high level for at least 5 min. Thirty min after the stimulation with the photolabile ester the co-precipitation of the different protein kinase C isoforms with α_{1b} -adrenoceptors was still above basal but only \approx 30-40 % (data not shown). Attempts to detect co-immunoprecipitation of protein kinase C ζ and α_{1b} -adrenoceptors were unsuccessful, although this isoform was easily detected in cell extracts (data not shown).

see García-Sáinz and Alcántara-Hernández, 1998). These isoforms were observed as discrete bands of protein kinase C α (\approx 80 kDa; in some experiments (see Figs. 2 and 3) as a doublet \approx 80-82 kDa and the bands were quantitated together), protein kinase C δ (\approx 78 kDa) and protein kinase C ϵ (\approx 95 kDa), in agreement with previous studies (García-Sáinz and Alcántara-Hernández, 1998). The concentration-response curves to PMA for the different protein kinase C isoforms are presented also in Fig. 1 (lower panels). It can be observed that all the isoforms increased their co-precipitation with α_{1b} -adrenoceptors in concentration-dependent fashions but that the magnitude varied from almost 3-fold (protein kinase C α) to less than 2-fold (protein kinase C δ and ϵ isoforms).

We next studied if other agents known to induce α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation were able to increase co-immunoprecipitation of these receptors and protein kinase C isoforms. Concentrations of the agents to maximally stimulate phosphorylation and a incubation time of 2 min were used. As shown in Fig. 2, norepinephrine, endothelin-1, lysophosphatidic acid and EGF were able to increase the co-immunoprecipitation of protein kinase C isoenzymes and α_{1b} -adrenoceptors. There was some variation in the ability of these agents to induce co-precipitation of the different kinase isoforms.

4.- Discussion

It is known that rat-1 fibroblasts express protein kinase C α , δ , ϵ and ζ isoforms (Berti et al., 1994; García-Sáinz and Alcántara-Hernández, 1998). In the present work we showed that protein kinase C isoforms immunoprecipitate with α_{1b} -adrenoceptors in the basal state and that agents known to increase α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation promoted

such co-immunoprecipitation (Diviani et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 1997; Casas-González et al., 2000; García-Sáinz et al., 2000; Medina et al., 2000).

Activation of protein kinase C is well known to block α_{1b} -adrenoceptor actions and to induce α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation (Diviani et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 1997; Casas-González et al., 2000; García-Sáinz et al., 2000; Medina et al., 2000). The protein kinase C-catalyzed receptor phosphorylation sites have been located in the carboxyl tail (Ser³⁹⁴ and Ser⁴⁰⁰) (Diviani et al., 1997). The present results indicate that several isoforms immunoprecipitate with the receptor. This suggests redundancy in their function or that they may achieve different functions. Protein kinase C α was the isoform that more strongly immunoprecipitate with the receptor in response to the phorbol ester.

Norepinephrine is well known to induce homologous desensitization of α_{1b} -adrenoceptors and receptor phosphorylation (Diviani et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 1997; Casas-González et al., 2000; García-Sáinz et al., 2000; Medina et al., 2000). G protein-coupled receptor kinases seem to play the major role (Diviani et al., 1996; Iacovelli et al., 1999). However, our data suggest that protein kinase C isoforms may participate in the desensitization/phosphorylation processes. It is well known that there is a close interplay between G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C (Chuang et al., 1995; Winstel et al, 1996).

Activation of receptors for endothelin, lysophosphatidic acid and EGF induce desensitization of α_{1b} -adrenoceptors associated to receptor phosphorylation (Vázquez-Prado et al., 1997; Casas-González et al., 2000; Medina et al., 2000) and in such processes protein kinase C plays a key role. Our present data are consistent with those findings. The differences observed in the immunoprecipitation of the protein kinase C

isoforms with the adrenoceptors may reflect the various processes involved in such actions (García-Sáinz et al., 2000).

Recently, it was reported that α_{1b} -adrenoceptor stimulation activated the Jak (Janus kinase)/STAT (signal transducer and activator transcription factor) pathway and that Jak and STAT also interact with these receptors as suggested by co-immunoprecipitation studies (Sasaguri et al., 1999). Also recently, Shih et al. (1999) reported that protein kinase A and protein phosphatases associate with β_2 -adrenoceptors forming dynamic complexes with participation of the anchoring protein gravin. Our current data further support the idea that protein kinase-receptor complexes could be relevant in receptor desensitization. Further experiments will be required to define if other molecular entities are involved and the relevant site(s) for such interactions.

Acknowledgements

This research was partially supported by Grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN 205199) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (27569N).

References

Berti, L., Mosthaf, L., Kroder, G., Kellerer, M., Tippmer, S., Mushack, J., Seffer, E., Seedorf, K., Häring, H., 1994. Glucose-induced translocation of protein kinase C in Rat-1 fibroblast is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 3381-3386.

Casas-González, P., Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A., 2000. Lysophosphatidic acid modulates α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation and function. Roles of G_i and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* 57, 1027-1033.

Chuang, T.T., Le Vine, H., De Blasi, A., 1995. Phosphorylation and activation of β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270, 18660-18665.

Diviani, D., Lattion, A.-L., Cotecchia, S., 1997. Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 28712-28719.

Diviani, D., Lattion, A.L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J.L., Cotecchia, S., 1996. Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 5049-5058.

García-Sáinz, J.A., Alcántara-Hernández, R., 1998. Hormonal modulation of membrane association of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts expressing α_{1B} -adrenoceptors. *Pharmacol. Rev. Commun.* 10, 119-124.

García-Sáinz, J.A., Alcántara-Hernández, R., Vázquez-Prado, J., 1998. α_1 -Adrenoceptor subtype activation increases proto-oncogene mRNA levels. Role of protein kinase C. *Eur. J. Pharmacol.* 342, 311-317.

García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., 2000. α_1 -Adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* 389, 1-12.

Iacovelli, L., Franchetti, R., Grisolia, D., De Blasi, A., 1999. Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, α_{1B} -adrenergic and A1 adenosine receptor-mediated responses. *Mol. Pharmacol.* 56, 316-324.

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

Newton, A.C., 1995. Protein kinase C: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28498.

Pawson, T., Scott, J.D., 1997. Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-2080.

Sasaguri, T., Teruya, H., Ishida, A., Abumiya, T., Ogata, J., 1999. Linkage between α_1 -adrenergic receptor and the Jak/STAT signalling pathway in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 25-30.

Shih, M., Lin, F., Scott, J.D., Wang, H.-Y., Malbon, C.C., 1999. Dynamic complexes of β_2 -adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J. Biol. Chem.* 274, 1588-1595.

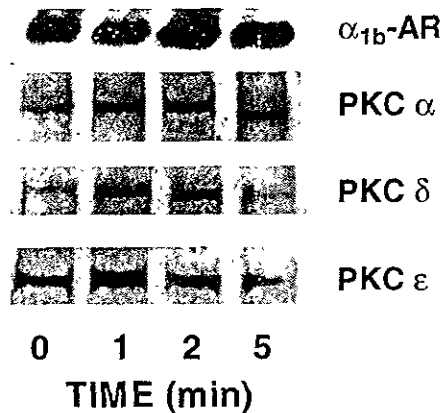
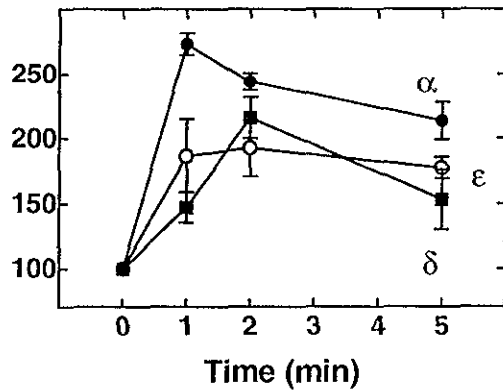
Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., García-Sáinz, J.A., 1997. Activation of endothelin ET_A receptors induce phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors in rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 27330-27337.

Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero, M.T., González-Espinosa, C., García-Sáinz, J.A., 2000. Norepinephrine and phorbol ester-induced phosphorylation of α_{1a} -adrenergic receptors. Functional aspects. *J. Biol. Chem.* 275, 6553-6559.

Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E., Lohse, M.J., 1996. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 2105-2109.

Fig. 1. Time-course and concentration-response curves for the effect of PMA on the co-immunoprecipitation of α_{1b} -adrenoceptors and protein kinase C isoforms. *Upper panels:* Cells were incubated for the times indicated in the presence of 1 μ M PMA. *Lower panels:* Cells were incubated with the indicated concentration of PMA for 2 min. Data were normalized to the co-immunoprecipitation observed in the absence of stimulus (100%). Plotted are the means and vertical lines represent the S. E. M. of 4-5 determinations using different cell cultures. α_{1b} -AR, α_{1b} -adrenoceptors. Representative immunoblots are presented.

Co-immunoprecipitation
(% of basal)



Co-immunoprecipitation
(% of basal)

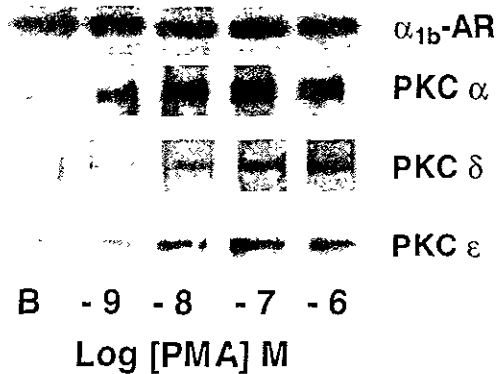
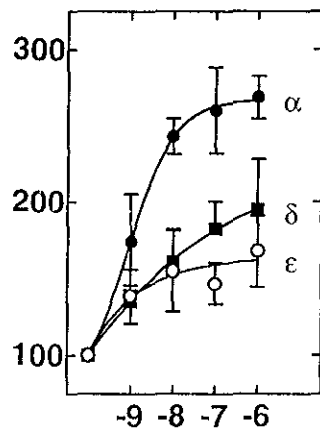


Fig. 2. Effect of hormones on the co-immunoprecipitation of α_{1b} -adrenoceptors and protein kinase C isoforms. Cells were incubated for 2 min in the absence of any agent (B) or presence of 10 μ M norepinephrine (NE), 10 nM endothelin-1 (ET-1), 1 μ M lysophosphatidic acid (LPA) or 100 ng/ml EGF (EGF). Data were normalized to the co-immunoprecipitation observed in the absence of stimulus (100%). Plotted are the means and vertical lines represent the S. E. M. of 4-5 determinations using different cell cultures. α_{1b} -AR, α_{1b} -adrenoceptors. Representative immunoblots are presented.

Co-immunoprecipitation
(% of basal)

