



293333

00591

3

UNAM
POSGRADO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS FACULTAD DE QUÍMICA**

**“REGULACION DEL RECEPTOR AT₁ PARA
LA ANGIOTENSINA II”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

(BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

M. EN C.Q. AGUSTIN ~~GARCIA CABALLERO~~



DIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ

MEXICO, D.F.

2001



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.

A mi ERE
Godira .

A mis papas, Agustín y Lucía

A Ricky, Yoia y Chicharo

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz por su apoyo, sobre todo económico, y por su siempre acertada dirección durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por sus asesorías y consejos a lo largo del desarrollo de la presente tesis, también por su interés y dedicación en la formación académica de los alumnos inscritos en el posgrado de ciencias bioquímicas, de la Facultad de Química.

Al Dr. Alberto J. Olivares-Reyes y al Dr. Kevin Catt por su gran apoyo e interés durante el desarrollo del presente estudio.

A los investigadores Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou, Dr. Lourival Possani Postay, Dr. Jean Louis Charli, Dr. Jorge Vázquez Ramos, Dra. Rosario A. Muñoz Clares, Dr. Ignacio Camacho Arroyo y Dra. Martha Robles Flores, quienes forman parte del jurado de examen, por la revisión crítica y sugerencias hechas a este trabajo.

A mis compañeros Selma Eréndira Avendaño-Vázquez, Rocío Alcántara-Hernández, Patricia Casas-González, Tere Romero, Alejandro Ruiz-Martínez, Fabián Flores-Jasso y excompañeros Alberto J. Olivares-Reyes, Marina Macías-Silva, Gloria Gutiérrez-Venegas, José Vazquez-Prado, Luz del Carmen Medina, Mario Cruz, Mari-Tere Lara, Artemio Mendoza-Mendoza, María Elena Torres-Padilla, Andrés Gottfried, Gonzalo Allende, por compartir el trabajo diario y experiencias académicas.

A la Dra. Amelia Farrés, al Dr. Jorge Vázquez y a la Dra. Rosario Muñoz por su contribución y esfuerzo para el buen funcionamiento del posgrado de la Facultad de Química.

A Lety García, Lupita Ramírez y Lupita Pérez por su disposición y apoyo para incontables trámites.

A Ivonne por su apoyo diario en mantener cierto orden y el material limpio en el laboratorio.

A Héctor Malagón por su ayuda en el manejo y cuidado de los conejos, así como su amable disposición en el trabajo, incluso durante periodos vacacionales.

A Marina Macías, Alberto Olivares, José Vázquez y Tere Ballado, por compartir su experiencia en algunas técnicas bioquímicas y de biología molecular.

A Amaranta Avendaño, Maura Cárdenas y Juan Barbosa por sus agradables visitas y oportunos consejos.

A Germán Montiel, Alberto Reyna y Leonardo García por su amistad añeja.

A Samuel Lara, Gaby Montero, Gaby Soid, Juan Estevez, Armando Rincón, Salvador Nava, Víctor Bautista, Valeria Ponce, Amaranta Avendaño, Mauricio Romero, Alexander de Luna, etc, también por su amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP), por su apoyo económico otorgado para la realización de esta tesis.

Al donativo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (27569N).

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	4
Introducción	5
Angiotensina II	5
Receptores de angiotensina II	8
Desensibilización	13
Internalización	15
Fosforilación	17
Diferentes estados conformacionales	18
Proteína Cinasa C (PKC)	19
Cinasa de fosfoinosítidos (PI-3K) y PKB	22
Antecedentes	27
Hipótesis	28
Objetivos	29
Resumen de Resultados	30
Validación del modelo	30
Desensibilización homóloga	31
Desensibilización heteróloga	31
Fosforilación homóloga	32
Fosforilación heteróloga	33
Resultados no publicados	33
Discusión	35
Sitios consenso de fosforilación	35
PI-3K y PKC	36
PKA	39
Cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs)	39
Proteínas G sensibles a la toxina de Pertussis	41
Heterodimerización	42
Aportaciones	43
Conclusiones	44
Referencias	46

ABREVIATURAS

Ang II, angiotensin II / angiotensina II

AKAP, A kinase anchoring protein / proteína multicontacto de la proteína cinasa A

β-arr, β-arrestin / β-arrestina

BIM, bisindolylmaleimide, protein kinase C inhibitor / inhibidor de la proteína cinasa C

C9, clone 9 cells / células clona 9

EGF, epidermal growth factor / factor de crecimiento epidérmico

GPCR, G protein-coupled receptor / receptor acoplado a proteína G

GRK, G protein-coupled receptor kinase / cinasa de receptor acoplado a proteína G

JNK, c-jun kinase / cinasa del proto-oncogen c-jun

LPA, lysophosphatidic acid / ácido lisofosfatídico

LY, LY294002, phosphoinositide 3-kinase inhibitor / inhibidor de la cinasa de fosfoinosítidos

MAPK, mitogen-activated protein kinase / proteína cinasa activada por mitógenos

PDGF, platelet-derived growth factor / factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDK1, phosphoinositide-dependent kinase-1 / cinasa-1 dependiente de fosfoinosítidos

PI-3K, phosphoinositide 3-kinase / cinasa de fosfoinosítidos (fosforila en posición 3')

PLA₂, phospholipase A₂ / fosfolipasa A₂

PLC, phospholipase C / fosfolipasa C

PLD, phospholipase D / fosfolipasa D

PMA, phorbol myristate acetate / forbol miristato acetato (éster de forbol)

PKA, protein kinase A / proteína cinasa A

PKB, protein kinase B / proteína cinasa B

PKC, protein kinase C / proteína cinasa C

PP2A, protein phosphatase 2A / proteína fosfatasa 2A

PP2B, protein phosphatase 2B / proteína fosfatasa 2B

PRK2, PKC-related kinase / cinasa parecida a la proteína cinasa C

PTX, pertussis toxin / toxina pertussis

TPA, tetradecanoyl phorbol acetate / tetradecanoil forbol acetato (éster de forbol)

WT, wortmannin, phosphoinositide 3-kinase inhibitor / inhibidor de la cinasa de fosfoinosítidos

[Ca²⁺]_i, intracellular calcium concentration / concentración intracelular de calcio.

RESUMEN

En este trabajo nos interesó en primer término estudiar la desensibilización del receptor endógeno de angiotensina II AT₁ en una línea celular epitelial, aislada de hígado de rata, denominada C9. Al realizar ensayos fluorométricos en este tipo celular para medir el incremento del calcio intracelular inducido por la angiotensina II, nos dimos cuenta que los receptores AT₁ se desensibilizan tanto homóloga como heterológamente. La liberación del calcio intracelular inducida por el agonista fue bloqueada completamente después de la desensibilización homóloga del receptor por 100 nM de angiotensina II, y fue disminuída en un 45% y 40% después de la desensibilización heteróloga causada por el ácido lisofosfatídico (1 μM) y la vasopresina (1 μM) respectivamente. También se observó una inhibición parcial y temprana del incremento de calcio inducido por la angiotensina II al pretratar a las células con activadores directos de la proteína cinasa A y de la proteína cinasa C, lo cual sugiere la participación de ambas cinasas en procesos de desensibilización del receptor.

Debido a que se ha considerado a la fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G como uno de los mecanismos de regulación de éstos y se le ha relacionado específicamente con la desensibilización de los receptores, nos enfocamos en profundizar en el estudio de la fosforilación homóloga (por la angiotensina II) y heteróloga del receptor AT₁ (por otros agentes distintos del agonista endógeno del receptor).

La fosforilación del receptor AT₁ inducida por el éster de forbol, TPA, y por la angiotensina II fue aditiva. La fosforilación del receptor AT₁ estimulada por el octapéptido angiotensina II se redujo parcialmente al inhibir las actividades de la proteína cinasa C y de la cinasa de fosfoinosítidos, con la previa incubación de las células con inhibidores específicos para ambas cinasas y también disminuyó significativamente (50%) por el pretratamiento de las células con la toxina de pertussis (100 ng / ml). La estimulación de las células C9 con 10 nM de vasopresina y 1 μM del ácido lisofosfatídico durante 5 minutos también incrementó la fosforilación del receptor, aunque ambos agentes tuvieron un efecto menor al

inducido por la dosis máxima de angiotensina II. La fosforilación del receptor AT_1 inducida por la vasopresina y el ácido lisofosfatídico se bloqueó casi completamente al inhibir a las isoformas de la proteína cinasa C con 1 μ M de bisindolilmaleimida I. La máxima fosforilación de la proteína cinasa B inducida por la angiotensina II se detectó a los 5 minutos con 1 μ M de la hormona y se bloqueó completamente con los inhibidores específicos de la cinasa de fosfoinosítidos (wortmanina 100 nM y LY294002 15 μ M), y con el antagonista selectivo para los receptores AT_1 (losartan 10 μ M). La angiotensina II estimuló la asociación de la proteína cinasa C δ a la membrana.

En conjunto, estos resultados demuestran que la fosforilación del receptor endógeno AT_1 inducida por la angiotensina II es mediada en parte por la proteína cinasa C y la cinasa de fosfoinosítidos, y que además están involucradas una vía que depende de las proteínas G_i / G_o y otra que depende de las proteínas G_q . Los datos sugieren que otras cinasas, como las GRKs, podrían estar involucradas en la fosforilación del receptor.

La desensibilización y fosforilación temprana del receptor AT_1 causada por la activación de otros receptores acoplados a proteínas G, como los receptores del ácido lisofosfatídico y de la vasopresina, o bien por la activación de la proteína cinasa C y de la proteína cinasa A, sugieren fuertemente que ambos procesos están relacionados. De tal manera que la fosforilación del receptor de angiotensina, AT_1 , inducida por su agonista natural o bien por otra hormona pudiera ser uno de los mecanismos causantes del proceso de desensibilización del receptor.

ABSTRACT

Desensitization and phosphorylation of the endogenous angiotensin II AT₁ receptor were studied in clone 9 liver cells. Agonist activation of AT₁ receptors blunted the response to subsequent addition of angiotensin II. Partial inhibition of the angiotensin II-induced calcium response was observed when cells were pretreated with dibutyryl cyclic AMP, TPA, vasopressin or lysophosphatidic acid. All of these desensitization processes were associated with receptor phosphorylation. Angiotensin II-induced AT₁ receptor phosphorylation was partially blocked by the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I, and by phosphoinositide 3-kinase inhibitors (wortmannin and LY294002); the actions of these inhibitors were not additive. Pertussis toxin pretreatment of cells also partially inhibited angiotensin II-induced AT₁ receptor phosphorylation. TPA-induced AT₁ receptor phosphorylation was completely blocked by bisindolylmaleimide I. AT₁ receptor phosphorylation was also induced by vasopressin and lysophosphatidic acid and these effects were partially inhibited by bisindolylmaleimide I. Angiotensin II increased Akt / PKB phosphorylation and protein kinase C membrane association. The effect on Akt / PKB phosphorylation was blocked by phosphoinositide 3-kinase inhibitors. These findings indicate that clone 9 cells exhibit both homologous and heterologous desensitization in association with AT₁ receptor phosphorylation. In these hepatic cells, angiotensin II-induced receptor phosphorylation involves pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins, and is mediated in part through protein kinase C and phosphoinositide 3-kinase.

ANGIOTENSINA II

La angiotensina II es considerada una hormona peptídica que regula una gran diversidad de procesos fisiológicos y metabólicos para mantener la homeostasis del organismo. El octapéptido además de regular la presión sanguínea y algunas funciones neuronales, también es particularmente importante en la recuperación del miocardio después de un infarto y en respuestas vasculares a la hipertensión (Tewksbury 1990).

Algunas de las principales acciones de la angiotensina II son la contracción del músculo liso vascular, la estimulación de la liberación de la aldosterona de las células glomerulares de la glándula suprarrenal y la reabsorción de sodio vía túbulo proximal e indirectamente vía la nefrona distal por aldosterona (Jackson *et al.*, 1996). Además de estos efectos directos sobre la presión sanguínea y el balance de electrolitos, esta hormona participa de manera importante en el metabolismo renal, hepático, endócrino, reproductivo y a nivel de sistema nervioso central (Phillips 1978), en donde la angiotensina II participa en la liberación de la vasopresina y la hormona adrenocorticotrópica de la glándula pituitaria.

La angiotensina II es un octapéptido, de secuencia; Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸, que regula diferentes procesos fisiológicos y metabólicos en humanos y en muchos mamíferos (Takei 1993); si bien es la hormona responsable de muchas de las funciones del metabolismo renal, vascular, etc, no es la única. Se han caracterizado tres tipos de angiotensinas, denominadas I, II y III (Fig. 1). Las tres hormonas son de naturaleza peptídica y se sintetizan de manera secuencial a partir de una proteína muy abundante en el plasma, el angiotensinógeno, el cual es producido por los hepatocitos y liberado al torrente sanguíneo. El angiotensinógeno es sustrato de la renina, una proteasa específica que es liberada a la circulación por el riñón y otros órganos. La acción de la renina sobre el angiotensinógeno genera una molécula decapeptídica poco activa denominada angiotensina I, la cual es adicionalmente procesada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima es liberada por las

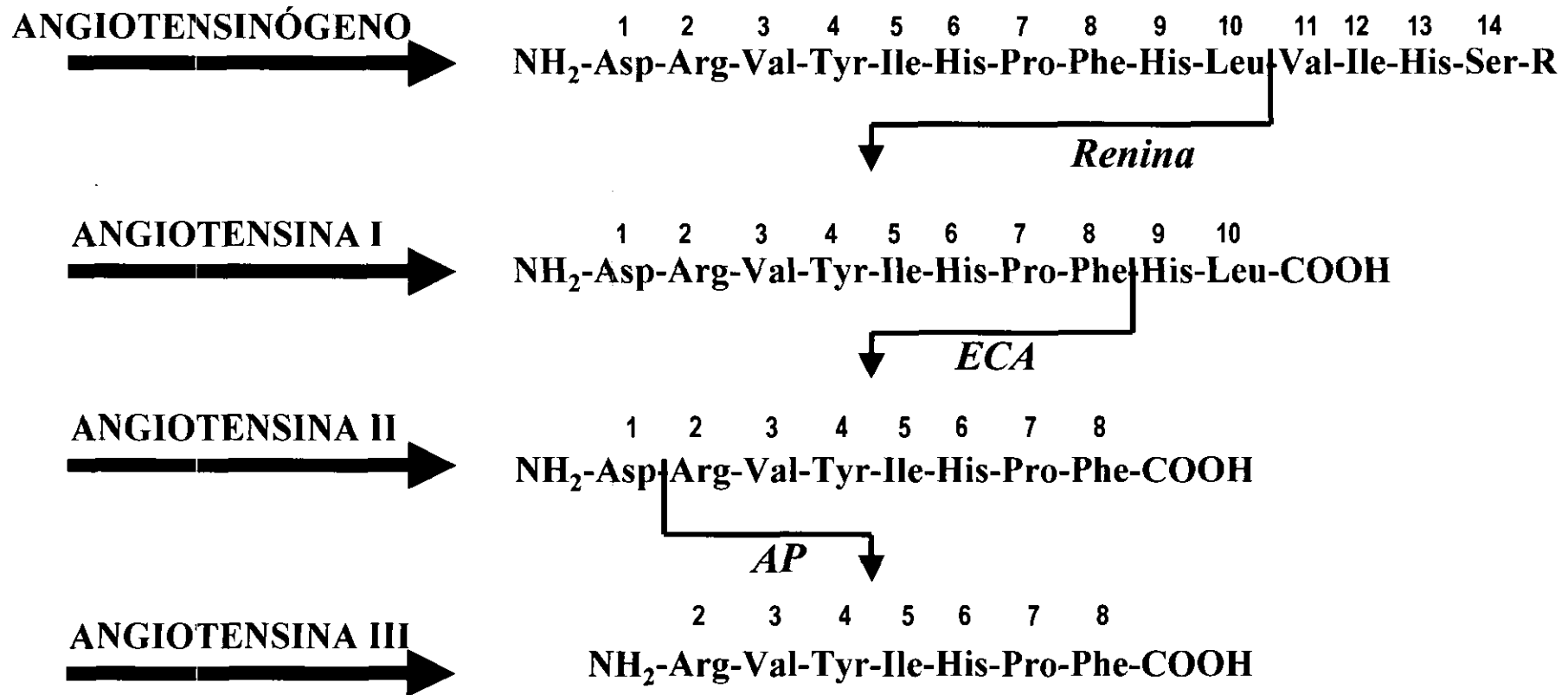


Fig. 1 Síntesis de las diferentes angiotensinas.

Las líneas representan la vía clásica de la síntesis de las angiotensinas I,II y III. -R: Secuencia residual del angiotensinógeno, ECA: enzima convertidora de angiotensina y AP: aminopeptidasa (Tomado de: Jackson EK y Garrison JC, 1996).

células endoteliales de los capilares y está presente en el torrente sanguíneo, para formar el octapéptido biológicamente activo angiotensina II (Fig. 1). Esta hormona octapeptídica es muy sensible a la proteólisis por una aminopeptidasa específica para aspártico, cuya acción da por resultado la formación de la angiotensina III. Ambas angiotensinas II y III causan efectos similares, siendo igual de potentes para estimular la secreción de aldosterona. Sin embargo, en otras acciones la angiotensina III es mucho menos potente que la angiotensina II, como es en la elevación de la presión sanguínea y en la estimulación de la médula suprarrenal para liberar catecolaminas (Peach 1977). Anteriormente se pensaba que las angiotensinas eran inactivadas al ser degradadas por varias endopeptidasas. Actualmente se sabe que se pueden generar fragmentos con especificidad y funciones importantes en diferentes órganos. De esta manera las angiotensinas I y II pueden ser metabolizadas a la angiotensina 1-7 (residuos 1-7), que es un producto de degradación de ambas angiotensinas (I y II). Este fragmento ejerce efectos tan importantes como lo son la liberación de vasopresina y la estimulación de la síntesis de prostaglandinas (Ferrario 1991). Recientemente se ha demostrado que otro fragmento producto de la degradación de la angiotensina II, conocido como angiotensina IV o angiotensina II (residuos 3-8), tiene proteínas receptoras específicas localizadas principalmente en la vasculatura renal, cerebral y en la del músculo liso (Ferrario 1991; Hall *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1995); en este último se ha propuesto que participa en la vasodilatación y en la regulación del flujo sanguíneo (Ferrario 1991; Hall *et al.*, 1993).

Ahora bien, la angiotensina II es más eficaz y potente para generar una gran diversidad de respuestas fisiológicas si se le compara con las acciones estudiadas de las otras angiotensinas I, III y IV. En lo sucesivo se considerará a la angiotensina II como la hormona directamente responsable de regular la presión sanguínea y algunas funciones neuronales, entre otros procesos, y por lo tanto se puntualizarán algunos aspectos relacionados sólo con esta hormona.

Mediante los estudios realizados para determinar la relación entre la estructura de la angiotensina II y su actividad, se ha demostrado que el extremo

carboxilo terminal de la molécula juega un papel muy importante en la actividad de la hormona; siendo particularmente importantes los tres grupos aromáticos de las cadenas laterales presentes en los residuos 4, 6 y 8 (Tyr, His y Phe). El aminoácido histidina, al parecer, es determinante para la unión al receptor (García-Sáinz y Olivares-Reyes, 1995). La importancia del grupo imidazol de este aminoácido está relacionada con su potencial para formar uniones no covalentes (Peach 1979).

Considerando la importancia del sistema renina-angiotensina en la regulación de la presión sanguínea y el balance de electrolitos, es de esperarse el descubrimiento de nuevas drogas como herramienta terapéutica. Así, por ejemplo algunos inhibidores de la ECA, como el captopril y el enapril, han resultado ser eficaces en un gran número de enfermedades vasculares, como en la hipertrofia vascular hipertensa, además de ser generalmente bien tolerados por los pacientes. Sin embargo, una de las acciones de la ECA es idéntica a la de la proteína cininasa II, una proteasa que participa en la degradación de las cininas, como bradicinina y en la degradación metabólica de la sustancia P. De esta manera, la inhibición de la ECA puede provocar un incremento tanto en la concentración de la sustancia P como en la de bradicinina, efectos que están involucrados en la tos seca y el angioedema que se presentan en las terapias que utilizan inhibidores de la ECA.

Los efectos de la angiotensina II en sus órganos blanco son mediados por receptores de membrana, de aquí que el receptor sea un punto de control clave para la regulación de las funciones tejido-específicas. Recientemente varios subtipos de estos receptores han sido clonados, lo cual ha ayudado a esclarecer los mecanismos moleculares que controlan la repuesta a angiotensina II en tejidos como el cardiovascular, el renal y el neuronal (Griendling *et al.*, 1996). Afortunadamente el reciente desarrollo de antagonistas subtipo-específicos para los receptores de angiotensina ha provisto de potentes agentes terapéuticos capaces de modificar las acciones del sistema renina-angiotensina a nivel del órgano blanco.

RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II

De los receptores que se activan por la hormona angiotensina II se han detectado 2 tipos, AT₁ y AT₂, con dos subtipos del AT₁ (AT_{1A}, AT_{1B}). En 1989, Whitebread *et al.* y Chiu *et al.*, caracterizaron farmacológicamente dos tipos de receptores angiotensina, los cuales se denominan actualmente como AT₁ y AT₂ (Bumpus *et al.*, 1991). Los receptores de tipo AT₁ son los responsables de mediar la mayoría de las funciones de la angiotensina II. La característica que los distingue farmacológicamente de los receptores tipo AT₂ es su alta afinidad por los bifenilimidazoles, como el losartan (Dup753) y su insensibilidad a las tetrahidroimidazopiridinas, como el PD123177 (Bumpus *et al.*, 1991) (Tabla I). Actualmente los subtipos de receptores mejor conocidos de la familia de los AT₁ en células de mamíferos son el AT_{1A} y el AT_{1B}. El receptor AT_{1A} se clonó de las células del músculo liso vascular de rata (Murphy *et al.*, 1991). Simultáneamente se clonó un receptor similar de la glándula adrenal de bovino (Sasaki *et al.*, 1991). Las secuencias relacionadas de ambos receptores tienen un marco de lectura abierto de 1077 pb, que codifica para 359 aminoácidos, con un peso molecular de 41-kDa. Hoy en día se han clonado cDNAs que codifican para receptores AT₁ en el humano (Bergsma *et al.*, 1992; Furuta *et al.*, 1992; Takayanagi *et al.*, 1992), en el conejo (Burns *et al.*, 1993), en el cerdo (Itazaki *et al.*, 1993) y en el perro (Sandberg 1994). La homología de estas clonas con el receptor AT₁ de rata y de bovino a nivel de proteína es mayor al 90% (Whitebread *et al.*, 1989).

Por otra parte se ha encontrado que las variantes AT_{1A} y AT_{1B}, tanto de rata como de ratón difieren solamente en 18 aminoácidos (Elton *et al.*, 1992; Sasamura *et al.*, 1992; Iwai e Inagami 1992; Kahar *et al.*, 1992a; Sandberg *et al.*, 1992), principalmente en la región carboxilo terminal de las proteínas, con una identidad en la secuencia del 94%.

Los estudios farmacológicos y funcionales de los receptores clonados de rata y ratón indican que ambos receptores, AT_{1A} y el AT_{1B}, presentan afinidades idénticas por la unión a diferentes ligandos (agonistas y antagonistas) y que se

NOMENCLATURA	AT₁	AT₂
ORDEN DE POTENCIA	AII > AIII	AII = AIII
AGONISTAS SELECTIVOS	L162017	[p-NH₂-Phe⁶]-Ang II, CGP42112
ANTAGONISTAS SELECTIVOS	Losartan Irbesartan Valsartan EXP3174	PD123177 PD123319
RADIOLIGANDOS	[³H] Losartan (8.1 nM) [¹²⁵I] EXP3174 (1.5 nM)	[¹²⁵I] CGP42112 (0.1nM)
ACOPLAMIENTO A PROTEINAS G	G_{q/11}, G_{i/o}	G_{iα2,3}
LOCALIZACION EN EL CROMOSOMA HUMANO	3q21-25	Xq22-23

Tabla I. Clasificación de los receptores de angiotensina II.

Entre paréntesis están los valores de Kd o constantes de afinidad

(Tomado de: Alexander SPH y Peters JA, 2000)

acoplan a los mismos mecanismos transduccionales (Sasamura *et al.*, 1992; Iwai e Inagami 1992; Kahar *et al.*, 1992a; Sandberg *et al.*, 1992) (Fig 2).

Por otro lado, el receptor AT₂ se clonó de una biblioteca genómica fetal de rata y de células neuronales PC12W (Kabayashi *et al.*, 1993; Mukoyama *et al.*, 1993). La estructura del receptor AT₂ es de siete dominios transmembranales con una masa molecular de 41 kDa. Sin embargo, la proteína de 363 residuos de aminoácidos es sólo 34% idéntica a la de los receptores AT₁ (Kabayashi *et al.*, 1993; Chang y Lotti 1990). Estos receptores poseen cinco sitios de glucosilación, a diferencia de los receptores AT₁ que sólo tienen tres sitios, además tienen un sitio potencial de fosforilación por la proteína cinasa C en la segunda asa intracelular y tres sitios en la cola citoplásmica, que también tiene una secuencia consenso para ser fosforilada por la proteína cinasa A (PKA) o dependiente del AMPc.

Los receptores AT₁ para angiotensina II pertenecen estructuralmente a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Fig. 2). Cada uno de los dominios extracelulares, en total cuatro, posee un residuo de cisteína, los cuales presumiblemente forman dos puentes disulfuro (uno entre el primero y último y otro entre el segundo y tercero) que estabilizan la estructura terciaria del receptor. Las regiones extracelulares, como ya se mencionó, tienen tres sitios consenso para N-glucosilación, por lo que se le puede encontrar a este receptor en diferentes grados de glucosilación y por ello con distinto peso molecular. El extremo carboxilo terminal del receptor AT₁, que es citoplásmico, es rico en residuos de serina y treonina; de hecho esta región tiene un segmento de 11 aminoácidos (Ser³²⁶-Thr³³⁶) que es fosforilado en respuesta a la angiotensina (Smith *et al.*, 1998b). En esta región se encuentran tres sitios consenso de fosforilación por la PKC (Ser³³¹, Ser³³⁸ y Ser³⁴⁸), además de un posible sitio de fosforilación (Ser³³⁵ y / o Thr³³⁶) para la GRK (del inglés G protein coupled receptor kinase). El extremo carboxilo terminal del receptor AT_{1A} también contiene un sitio de palmitoilación (Cys³⁵⁵) que pudiera estar relacionado con el anclaje de esta parte del receptor a la membrana y / o en el acoplamiento con moléculas efectoras (Fig. 2) (Sandberg 1994).

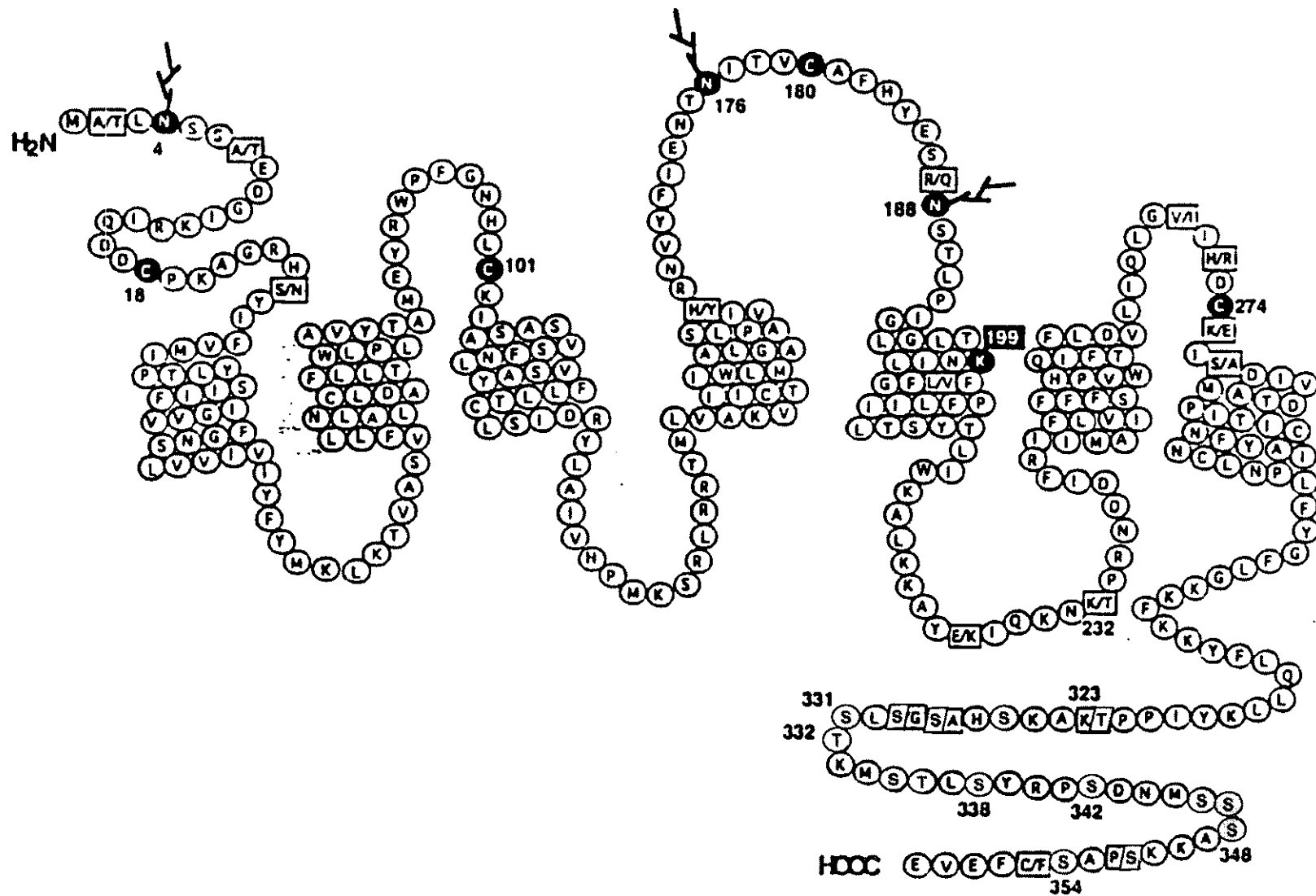


Fig. 2 Diagrama esquemático de la secuencia de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} de rata.

Se indican los cuatro residuos de cisteína involucrados en la formación de dos puentes disulfuro (C), los tres sitios potenciales de glucosilación (N) y los posibles sitios de fosforilación (S y T). Cada receptor tiene 359 aminoácidos. Los aminoácidos divergentes se indican encerrados en cuadros; los aminoácidos del lado izquierdo de cada cuadro indican los que se encuentran en la secuencia del subtipo AT_{1A} y los que se localizan del lado derecho corresponden al AT_{1B}. La formación de los puentes disulfuro, junto con la Lys¹⁹⁹ contribuyen a la unión del ligando (Griendling KK, y Wayne RA, 1996).

La distribución de los subtipos de receptores AT_{1A} y AT_{1B} de rata se ha estudiado sólo a nivel de la detección del RNAm ya que estos receptores son indistinguibles farmacológicamente. Ambos subtipos se expresan en cantidades similares en el bazo, hígado y riñón (Kahar *et al.*, 1992a; Sandberg *et al.*, 1992). Sin embargo, el receptor AT_{1A} de rata predomina en el músculo liso vascular, corazón, pulmón y cerebro (Kahar *et al.*, 1992a; Sandberg *et al.*, 1992; Kahar *et al.*, 1992b; Kitami *et al.*, 1992); mientras que el subtipo AT_{1B} predomina en las glándulas pituitaria, suprarrenal (Iwai e Inagami 1992; Kahar *et al.*, 1992a; Sandberg *et al.*, 1992; Kahar *et al.*, 1992b; Kitami *et al.*, 1992) y en el cerebro (Kahar *et al.*, 1992b). Aunque ambos subtipos se expresan en el cerebro de rata, el AT_{1A} se expresa predominantemente en el hipotálamo y el AT_{1B} en las regiones llamadas “subfornical organ” (SFO) y “organum vasculosum” de la lámina terminal (OVLT) y en el cerebelo (Kahar *et al.*, 1992b). Kahar y colaboradores consideran que el receptor AT_{1B}, que se expresa en las regiones antes mencionadas, podría ser el responsable de regular la sensación de sed causada por la angiotensina II. Así, existe una expresión diferencial de ambos subtipos en diversos tejidos y en la actualidad la regulación de la expresión de los receptores es un área de amplio interés.

Por otro lado, los receptores AT₂ se expresan mayoritariamente en diversos tejidos embrionarios y su expresión disminuye dramáticamente después del nacimiento (Koike *et al.*, 1994; Tsutsumi y Saavedra 1991; Gradi *et al.*, 1991; Feuillan *et al.*, 1993). Estos receptores se expresan en el músculo esquelético, en la médula suprarrenal (Feuillan *et al.*, 1993), en la aorta fetal (Viswanathan *et al.*, 1991) y en algunas áreas del cerebro de ratas recién nacidas, en áreas sensoriales y en algunas estructuras del sistema límbico (Tsutsumi y Saavedra 1991). Mediante el análisis del RNAm de receptores AT₂ con la técnica de “Northern blot” se ha detectado la expresión de estos receptores en las glándulas suprarrenales, en el cerebro y en el útero. Con la ayuda de metodología más sensible como el RT-PCR (del inglés Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) se han detectado niveles bajos de expresión de este receptor en el corazón, hígado, riñón y pulmón (Koike *et al.*, 1994).

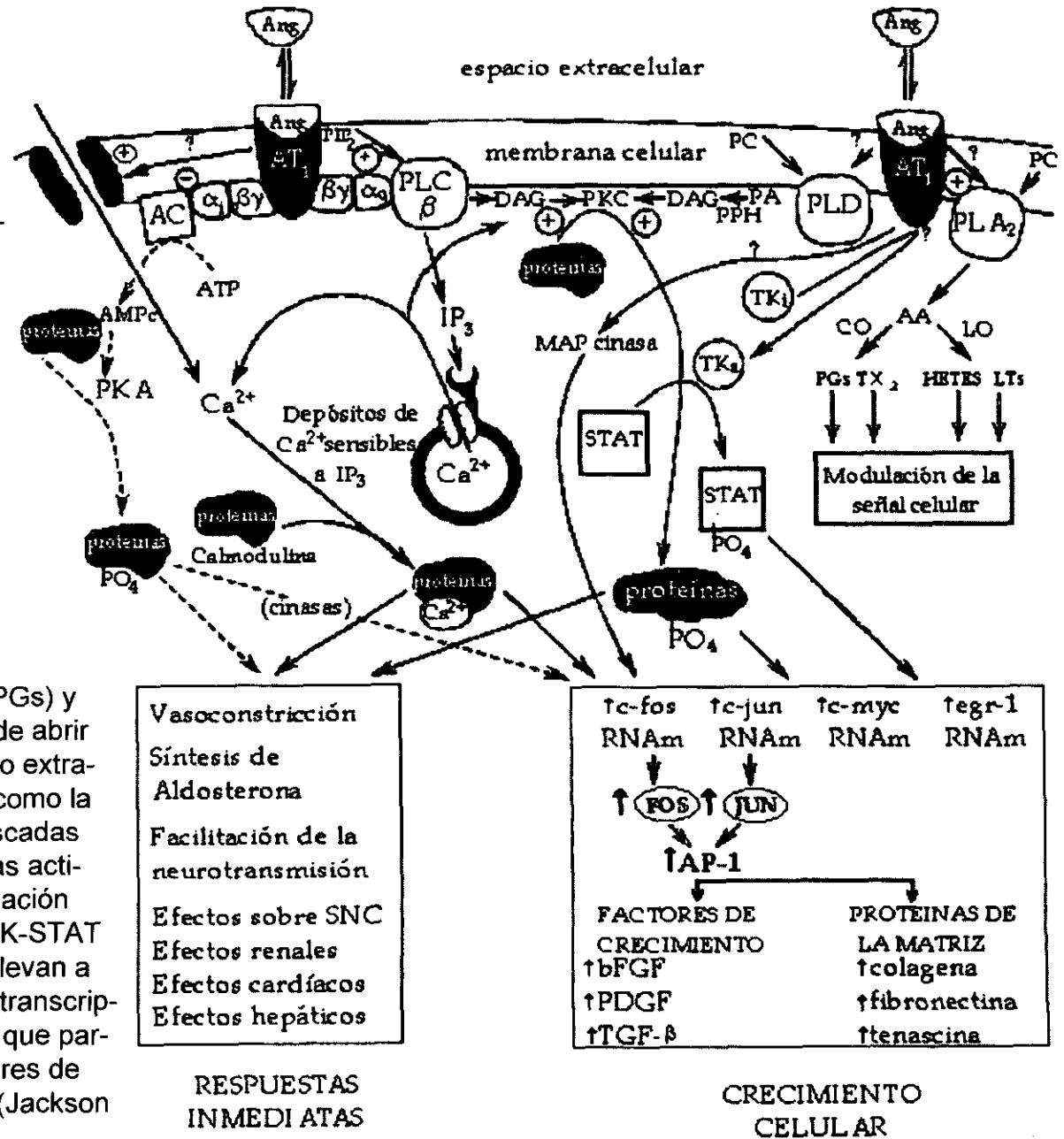
Los receptores AT_2 pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, y se ha demostrado la interacción de estos receptores con las proteínas $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$ y además se ha observado que pueden regular la actividad de algunas proteínas fosfatasa (Griendling *et al.*, 1996). De hecho, se conoce poco acerca de las moléculas efectoras que participan en los sistemas transduccionales activados por estos receptores. Hasta la fecha se han propuesto tres tipos diferentes de activación de segundos mensajeros para los receptores AT_2 en tejidos específicos; la inhibición de la producción de GMPc (Summers y Myers 1991; Bottari *et al.*, 1992), la activación de los canales de potasio (Kang *et al.*, 1992) y la inhibición de una fosfatasa específica de tirosina (Kabayashi *et al.*, 1993; Bottari *et al.*, 1992). La mejor evidencia experimental que se tiene hasta ahora proviene de experimentos en los que se ha clonado al receptor AT_2 y se ha expresado en células COS-7 (Kabayashi *et al.*, 1993). En estos estudios, la angiotensina II no tuvo efecto en los niveles del GMPc, sin embargo inhibió significativamente la actividad de fosfatasa en fosfotirosina a nivel de la membrana plasmática. Es por ello comúnmente aceptado que los receptores AT_2 estén actuando a través de una fosfatasa en tirosina.

Los receptores AT_1 se acoplan característicamente a las proteínas $G_{q/11}$ y $G_{i/o}$, activando diferentes mecanismos transduccionales, entre ellos a las fosfolipasas A_2 , C y D, así como a canales de calcio dependientes de voltaje y también inhiben a la adenilato ciclasa (AC) (Fig. 3). La activación o inhibición de las moléculas efectoras por los receptores depende por completo del tipo celular del cual se trate. Además, los receptores AT_1 también activan directamente a cinasas de tirosina (Paxton *et al.*, 1994; Marrero *et al.*, 1994) aunque faltan aún más estudios para esclarecer las rutas transduccionales completas.

La activación de las fosfolipasas C y D da como resultado la producción de los ya clásicos segundos mensajeros; inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), sólo que de manera distinta; es decir ambas fosfolipasas generan al diacilglicerol a partir de diferentes substratos. Por ejemplo, cuando los receptores AT_1 son

Fig. 3 Mecanismos transduccionales del receptor AT₁.

La hormona angiotensina II (ang II) se une al receptor AT₁, el cual activa a las fosfolipasas C-β (PLC-β), D (PLD), y A₂ (PLA₂) e inhibe a la adenilato ciclasa (AC). El receptor está acoplado al efector por medio de proteínas G (representados por las subunidades α, β y γ). La PLC-β hidroliza al fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂), para producir inositol trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a un receptor específico que induce la liberación del ión calcio de compartimentos intracelulares; el calcio y el DAG activan a la proteína cinasa C (PKC). La PLD hidroliza a la fosfatidilcolina (PC) hasta ácido fosfatídico (PA) y colina. El PA se puede convertir en DAG por acción de la fosfatido-fosfohidrolasa (PPH). La PLA₂ hidroliza a la PC liberando al ácido araquidónico (AA), un precursor de leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TX). La angiotensina II también puede abrir canales de calcio a través de los cuales entra calcio extracelular que participa en la activación de proteínas como la calmodulina. La angiotensina II también activa cascadas de fosforilación como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (cascada de fosforilación en serinas y treoninas) o la vía de las proteínas JAK-STAT (cascada de fosforilación en tirosinas). Estas vías llevan a la expresión de genes (*c-fos*, *c-jun*) que regulan la transcripción de varios genes que codifican para proteínas que participan en el crecimiento celular, incluyendo a factores de crecimiento y a proteínas de la matriz extracelular (Jackson EK, y Garrison JC, 1996).



estimulados se activa la fosfolipasa C a través de la proteína G_q . La fosfolipasa C hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP_2) para generar inositol 1,4,5, trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Fig. 3). También se puede dar un incremento de DAG indirectamente por medio de la actividad de la PLD la cual hidroliza la fosfatidilcolina y produce ácido fosfatídico, el cual se convierte en DAG por una fosfohidrolasa. El DAG junto con la fosfatidilserina y el calcio activan a la proteína cinasa C (PKC) y ésta fosforila proteínas clave que contribuyen por ejemplo en el crecimiento celular y / o la contracción del músculo liso vascular y del músculo cardíaco, para lo cual también participa el IP_3 al liberar el calcio de los reservorios intracelulares que activa a diversas enzimas dependientes de calcio / calmodulina (Fig. 3) (Jackson y Garrison 1996). Cabe mencionar que la PLD, a diferencia de las fosfolipasas C y A_2 , no es activada por proteínas G. Se observó, muy recientemente, que la fosfolipasa D se activa por el ácido 20-hidroxicosatotetraenoico en respuesta a la angiotensina II y a la norepinefrina (Parmentier *et al.*, 2001a; Parmentier *et al.*, 2001b).

Los receptores AT_1 pueden activar a varios tipos de fosfolipasa C, ya que se demostró que la fosfolipasa C- γ es activada directamente por estos receptores en células de músculo liso vascular de una manera independiente de proteínas G (Marrero *et al.*, 1994), en contraste con la activación de la fosfolipasa C- β que requiere de una proteína insensible a la toxina pertussis (Ptx) como G_q .

El receptor AT_1 no sólo activa a la fosfolipasa C o a la PLD, sino también a la fosfolipasa A_2 (probablemente a través del incremento en Ca^{2+} y la actividad de la PKC) la cual produce ácido araquidónico, al hidrolizar el enlace éster en posición 2 de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. El ácido araquidónico es metabolizado a prostaglandinas y tromboxanos por ciclooxigenasas y a ácidos hidroxicosatotetraenoicos y leucotrienos por lipooxigenasas. Así, el ácido araquidónico y sus derivados modifican la respuesta celular final al activar sus propios receptores. Cabe mencionar que existe evidencia experimental de la participación de una proteína G_i en la activación de la fosfolipasa A_2 inducida por

la angiotensina II en células mesangiales de riñón, ya que esta activación es inhibida por la toxina pertussis (Pfeilschifter y Bauer 1986).

Por otro lado, en algunos tipos celulares se ha observado que la activación del receptor AT_1 disminuye los niveles de AMPc intracelulares al inhibir directamente a la adenilato ciclasa (AC) por medio de una proteína G_i sensible a la toxina pertussis (Douglas *et al.*, 1990).

Además, la activación de los receptores AT_1 induce la fosforilación, vía tirosina cinasas citosólicas, de algunos factores transcripcionales como Stat91 (Bhat *et al.*, 1994), o bien la fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). De hecho hay suficiente evidencia experimental para apoyar el concepto de interacciones entre los receptores AT_1 y la cinasa raf-1 (Molloy *et al.*, 1993), así como la cinasa src (Paxton *et al.*, 1994), entre otras cinasas de tirosina.

DESENSIBILIZACION

Actualmente se conoce que la exposición prolongada de las células a agonistas conduce a la rápida pérdida o incapacidad de los receptores de superficie para responder. A este fenómeno se le llamó "desensibilización" y se ha demostrado que existe para un vasto número de receptores de membrana acoplados a proteínas G. Por ejemplo para los receptores β_2 adrenérgicos (Benovic *et al.*, 1988; Lohse *et al.*, 1990), los α_1 adrenérgicos (Corvera y García-Sáinz 1984; Corvera *et al.*, 1986), para los receptores de angiotensina AT_1 , ya sea en células que los expresan endógenamente (Abdellatif *et al.*, 1991; Boulay *et al.*, 1994) o bien en células transfectadas con los receptores AT_1 clonados (Tang *et al.*, 1995; Oppermann *et al.*, 1996; Balmforth *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1998), entre otros.

Al proceso de desensibilización se le ha clasificado en dos tipos, desensibilización homóloga y desensibilización heteróloga, de acuerdo a la menor respuesta que presentan las células si son tratadas con agentes que

originalmente estimularon las células (homóloga) por tiempo prolongado o con agentes no relacionados con el estímulo inicial (heteróloga). Esta clasificación resulta útil para conocer el origen o fuentes causantes de la desensibilización y cabe mencionar que ambos procesos pueden ocurrir al mismo tiempo en las células.

A lo largo de estos últimos años se ha estudiado el proceso de desensibilización de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, para los cuales se ha establecido una co-relación entre la fosforilación en residuos de serina y treonina de su extremo carboxilo y los procesos de desensibilización e internalización. El proceso de desensibilización reportado para los receptores tipo AT₁, tanto de los que se expresan endógenamente como de los receptores clonados y transfectados en diferentes líneas celulares, presenta un sinergismo de varios procesos tales como la fosforilación en sitios específicos del receptor, el desacoplamiento del receptor de las proteínas G heterotriméricas, el tráfico intracelular del receptor como por ejemplo la internalización y reciclamiento de éste, el proceso de "down-regulation" del mismo y la interacción de proteínas reguladoras con las regiones citoplásmicas del receptor (Thomas 1999). El término en inglés "receptor down-regulation" se refiere esencialmente a la disminución del número de receptores en la superficie membranal debido, por ejemplo, a un decremento en los niveles de RNA mensajero. De hecho, en el caso de la desensibilización de las respuestas mediadas por el receptor AT₁, se ha observado en células de la zona glomerular adrenal bovina que con el pretratamiento de 1 µM de angiotensina II por 12-24 horas, no sólo disminuye la producción de los fosfatos de inositol sino también disminuyen los niveles del RNA mensajero del receptor AT₁ y el número de receptores en membrana (Richard *et al.*, 1997).

En 1996 Walter G. Thomas *et al.*, demuestran que la respuesta de incremento en el calcio intracelular inducida por 1 µM de angiotensina no se modifica cuando los fibroblastos cardíacos son pretratados con 100 nM del éster de forbol (PMA) por 10 minutos (tratamiento agudo) o bien con 400 nM de PMA por 24 horas (tratamiento crónico). Evidentemente, estos resultados sugieren que

la proteína cinasa C no regula la respuesta inducida por angiotensina a través del receptor AT_{1A}, que es el subtipo de receptor que se expresa en este tipo celular. Resultados opuestos a lo descrito por Walter Thomas y colaboradores, muestran que la PKC sí participa en la desensibilización de la respuesta inducida por angiotensina II (Balmforth *et al.*, 1997). El experimento que lo demuestra consistió en medir los niveles de fosfatos de inositol (IP₃) en las células de riñón de embrión humano (HEK 293) que expresan al receptor AT_{1A} de manera estable y lo que observan es una disminución muy clara de IP₃ cuando preincuban las células con TPA (100 nM) por 10 minutos y esta disminución es bloqueada cuando las células se preincuban también con 10 μ M del inhibidor (Ro-31-8220) de la PKC.

Debido a que existe controversia acerca del papel de la actividad de la PKC en el proceso de desensibilización en las respuestas inducidas por angiotensina II en diferentes tipos celulares, nos interesó conocer si la PKC participa en este mismo proceso en las células epiteliales de hígado de rata, C9. La ventaja de usar este modelo en particular consiste en la capacidad que tienen las células C9 para responder a la angiotensina II (García-Sáinz y García-Caballero 1998).

INTERNALIZACION

La internalización o secuestro de los receptores está definida como la translocación de los receptores de la superficie de membrana a compartimentos membranales que son inaccesibles a ligandos hidrofílicos (Staehein y Simons 1982). El proceso de internalización se ha estudiado para una gran variedad de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas y actualmente se conoce mucho más del receptor β_2 -adrenérgico. Se ha demostrado que el secuestro de este receptor requiere de la unión de proteínas llamadas " β -arrestinas", denominadas así por su capacidad para "arrestar" o bloquear la activación del receptor o su acoplamiento con las proteínas G. Las proteínas β -arrestinas se unen a la cola citoplásmica del receptor una vez que éste ha sido activado por su agonista (adrenalina) y fosforilado en residuos de serina por cinasas de receptores acoplados a proteínas G o GRKs (Zhang *et al.*, 1996; Ferguson *et al.*, 1997;

Krupnick y Benovic 1998). Ya que las β -arrestinas se han unido únicamente a los receptores fosforilados, estas proteínas con la ayuda de otras como la dinamina dirigen a los receptores al interior celular e inducen la formación de las vesículas de clatrina (Fig. 4) (Goodman *et al.*, 1996). Así, las β -arrestinas no sólo intervienen en el desacoplamiento de los receptores activados por sus agonistas con las proteínas G heterotriméricas, sino también intervienen en el proceso de internalización de los receptores mediante la formación de las vesículas de clatrina. Muy recientemente se ha observado por co-inmunoprecipitación y ensayos de doble-híbrido en levadura (ambos ensayos detectan proteínas que interactúan entre sí) que las β -arrestinas tipo 2 (McDonald *et al.*, 2000) también se pueden unir a otras proteínas como la JNK3 (del inglés c-Jun kinase) o cinasa de c-Jun, a la MAPK4 (del inglés mitogen-activated protein kinase) y a la ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1); esta última proteína es un activador apoptótico. En este mismo trabajo, los autores demuestran que la estimulación del receptor de angiotensina II, AT_{1A}, activa a la cinasa JNK3 y promueve la co-localización de ésta con la β -arrestina 2 en vesículas intracelulares. Por tanto, estos resultados experimentales sugieren que las β -arrestinas tipo 2, también pueden regular la distribución de otras proteínas efectoras de las cascadas transduccionales activadas por receptores acoplados a proteínas G.

De la internalización de los receptores de angiotensina se había reportado en 1996 por Zhang y colaboradores, que el receptor AT_{1A} se internalizaba sin la ayuda de la dinamina, por lo que el proceso de internalización de estos receptores era no sólo independiente de la dinamina sino también de la β -arrestina y sólo en condiciones de sobre-expresión de la β -arrestina, el receptor se internalizaba de manera dependiente de la dinamina. Sin embargo, Gáborik *et al.*, han demostrado contundentemente que la internalización del receptor AT₁ es completamente dependiente de la β -arrestina y de la dinamina y además que la endocitosis del receptor depende fundamentalmente de la concentración de la angiotensina II utilizada para estimular en los ensayos. Lo anterior lo observaron al usar una dosis de la hormona en el rango subnanomolar (0.2 nM) (dosis óptima) y otra del rango nanomolar (30 nM) en los ensayos de internalización en células de ovario

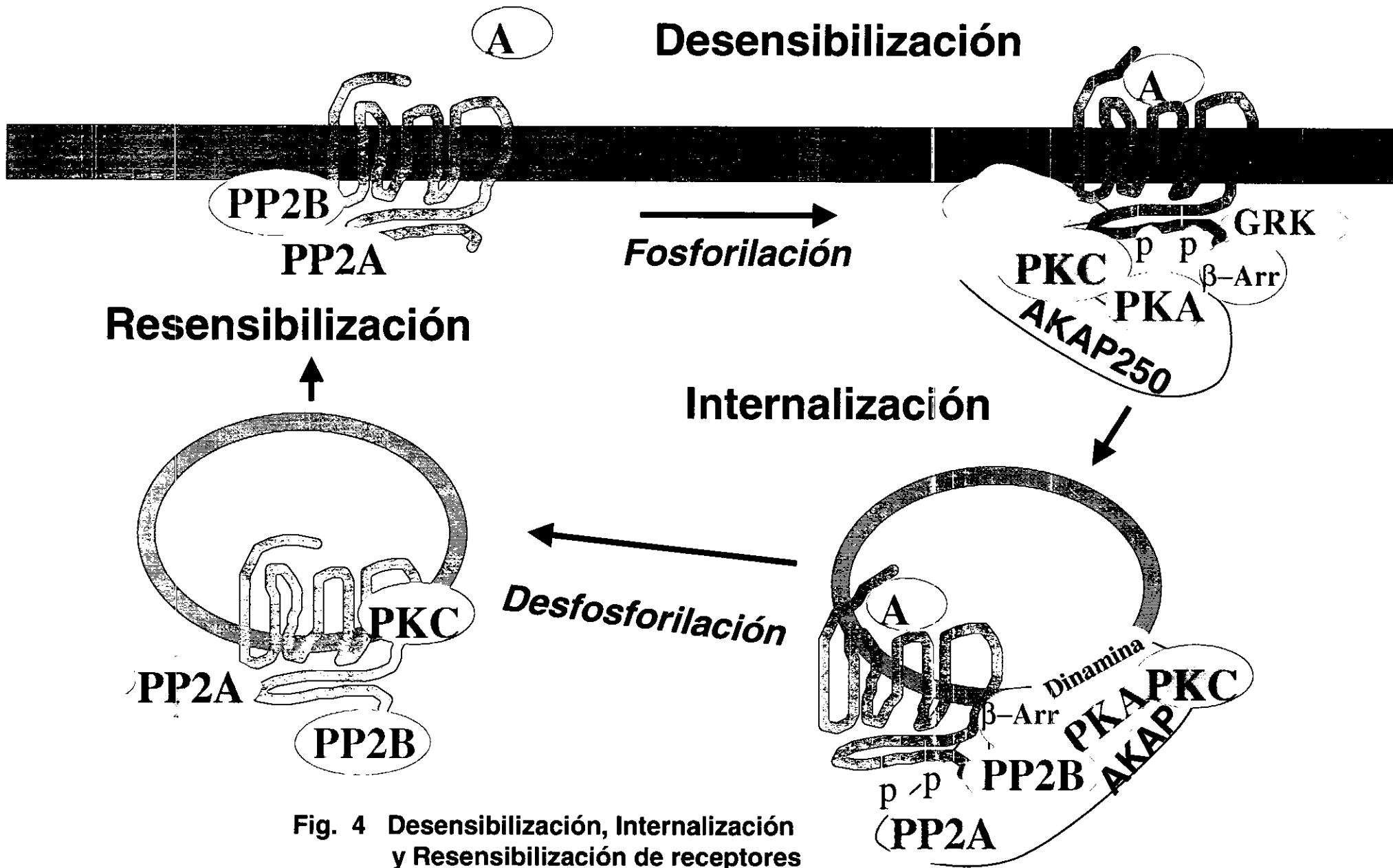


Fig. 4 Desensibilización, Internalización y Resensibilización de receptores acoplados a proteínas G.

Fig. 4

Desensibilización, Internalización y Resensibilización de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas.

En el esquema se muestra el ciclo de desensibilización-internalización y resensibilización de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. **A**, agonista; **PP2A** y **PP2B**, proteínas fosfatasas, **PKC**, proteína cinasa C; **PKA**, proteína cinasa A; **GRK**, cinasa de receptores acoplados a proteínas G; **β-arr**, β-arrestina; **AKAP(250)**, proteína multicontacto de la proteína cinasa A; **P**, grupo fosfato.

de hamster transfectadas transitoriamente con el receptor AT₁ y con la mutante dominante negativa de dinamina-2 (K44A).

A diferencia del receptor AT₁ y de muchos otros receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, el receptor AT₂ no se internaliza en presencia de su agonista endógeno, la angiotensina II (Hunyady *et al.*, 1994; Hein *et al.*, 1997), sin embargo sí se fosforila, al igual que el receptor AT₁. De hecho se ha identificado que es la Ser³⁵⁴ en el extremo carboxilo terminal del receptor, el principal residuo fosforilado en respuesta a la activación de la PKC por el TPA o bien por la angiotensina II. Además, el receptor AT₂ puede ser fosforilado de manera heteróloga por la activación del receptor AT₁ de manera dependiente de la PKC (Olivares-Reyes *et al.*, 2000).

FOSFORILACION

Recientemente se ha demostrado que la fosforilación del receptor AT₁ endógeno en células de la zona glomerular adrenal de bovino es dependiente de la concentración de la angiotensina II; además, que la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA) son las responsables de fosforilar al receptor aunque muy probablemente no sean las únicas cinasas involucradas, ya que la estimulación de ambas cinasas no lleva al grado de fosforilación inducida por el agonista (Smith *et al.*, 1998a). Se ha observado que la sustitución de la Ser³³⁵ y de la Thr³³⁶ por alaninas no solamente afecta la fosforilación del receptor AT₁ mutado, sino también su proceso de internalización (Smith *et al.*, 1998b). Qian en 1999 utilizó la misma estrategia experimental y observó que la mutación de serinas por alaninas de los tres sitios consenso (Ser³³¹, Ser³³⁸ y Ser³⁴⁸) de fosforilación del receptor AT₁ por la PKC, disminuía un 70% la fosforilación mediada por la PKC y un 60% la fosforilación inducida por la angiotensina II. Así, en este trabajo observaron que ninguna de las mutantes sencillas o bien la triple mutante del receptor evitaban por completo la fosforilación del receptor y además que los tres sitios consenso de fosforilación por la PKC estaban involucrados en la estimulación homóloga (angiotensina II) y heteróloga (PMA) del receptor AT₁.

En 1996, Oppermann y colaboradores demostraron la fosforilación del receptor AT₁ por otro grupo de cinasas, las cinasas de receptores acoplados a proteínas G, específicamente las GRK2, GRK3 y GRK5. Todas estas cinasas fosforilan en menor o mayor grado al receptor AT₁ en respuesta a la angiotensina II cuando se co-transfectan estas cinasas, cada una por separado, con el receptor en células de riñón de embrión humano (HEK 293).

En el presente trabajo se estudia la participación de otras cinasas, además de la PKC y PKA, en la fosforilación del receptor AT₁ tales como la cinasa de fosfoinosítidos PI-3K y la relación del proceso de fosforilación con la desensibilización del receptor.

DIFERENTES ESTADOS CONFORMACIONALES

Mediante el análisis de los resultados de algunos estudios sobre la activación de receptores acoplados a proteínas G, se han generado algunas teorías comúnmente aceptadas. El modelo clásico predice dos estados del receptor, el estado inactivo (R) y el estado activo (R*); en ausencia del agonista se sugiere que existe un equilibrio entre ambos estados que favorece al estado inactivo (R). La conformación activa del receptor (R*) es inducida por la unión del agonista favoreciendo este estado, acoplándose el receptor a la(s) proteína(s) G y demás moléculas efectoras (Lefkowitz *et al.*, 1993; Leff 1995). Con el estudio de receptores constitutivamente activos, ya sea con receptores mutantes o bien silvestres pero sobre-expresados por transfección celular, se ha propuesto un modelo de tres estados conformacionales del receptor, que incluye al estado inactivo (R) y dos diferentes estados activos del receptor (R*) y (R**). Ambos estados activos del receptor pueden mostrar distintos ordenes de afinidad y de eficacia para los agonistas dependiendo de las rutas transduccionales a las que se acople el receptor (Samama *et al.*, 1993; Scaramellini y Leff 1998). A diferencia del modelo de activación del receptor de dos estados, donde un sólo estado de receptor activo (R*) no puede acoplarse de manera diferente a dos rutas transduccionales por agonistas diferentes. En ambos modelos, se sugiere que los

estados conformacionales activos del receptor son los substratos de fosforilación por las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y por las cinasas activadas por segundos mensajeros, PKC y PKA. De hecho, se ha observado un aumento en la fosforilación independiente del agonista en diferentes receptores constitutivamente activos, como en los receptores α_{2A} y β_2 adrenérgicos (Ren *et al.*, 1993; Pei *et al.*, 1994). En estos últimos receptores también se observó desensibilización constitutiva (Pei *et al.*, 1994).

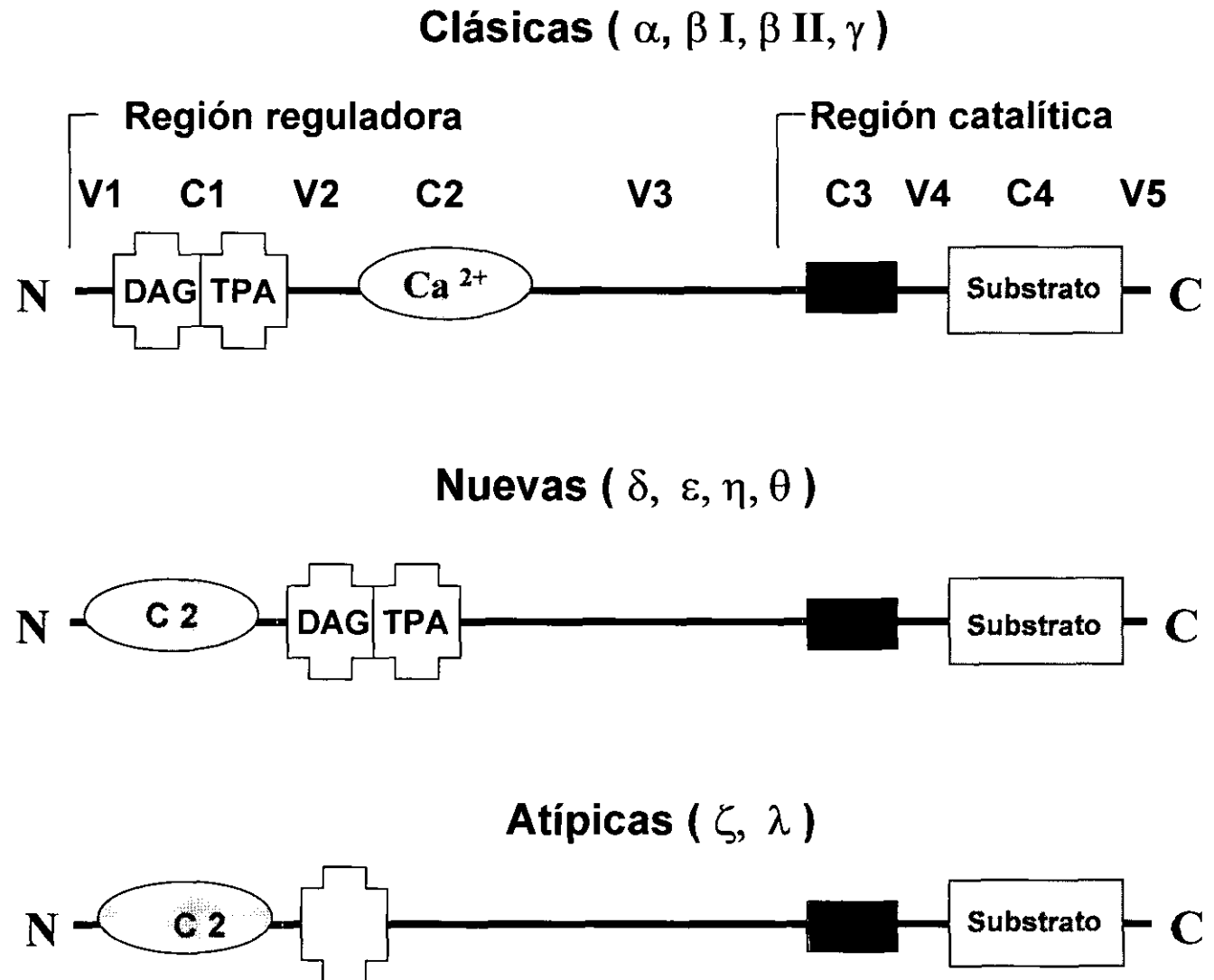
En contraste, recientemente se ha demostrado que el receptor AT_{1A} constitutivamente activo, por la substitución de la Asn¹¹¹ por una alanina o una glicina en el tercer segmento transmembranal, no se fosforila en respuesta a 100 nM de angiotensina II, ni se modifica la fosforilación basal del receptor pero sí se internaliza (Thomas *et al.*, 2000). En el mismo estudio se observó que el análogo inactivo de la angiotensina II, [Sar¹, Ile⁴, Ile⁸] Ang II, fue capaz de incrementar la fosforilación del receptor silvestre pero no fue capaz de inducir la internalización ni del receptor silvestre ni del receptor constitutivamente activo. Aparentemente se puede distinguir a la fosforilación del receptor y a la internalización de éste como dos procesos separados y además ambos procesos dependientes del estado conformacional que pueda adquirir el receptor. Por otro lado, se ha observado que el incremento en la fosforilación inducida por el agonista de un receptor constitutivamente activo (5-HT_{2C} receptor de serotonina) co-relaciona con la desensibilización de la respuesta inducida por el agonista (Westphal *et al.*, 1995).

PROTEÍNA CINASA C

Hasta el momento se han descrito 12 isoformas de cinasas de serina y treonina de la familia de la proteína cinasa C (PKC), las cuales se han clasificado en tres grupos de acuerdo a sus diferencias en estructura y requerimientos por los cofactores (Fig. 5) (Newton 1995). Del primer grupo o PKCs convencionales (α , β I, β II y γ), también denominadas como clásicas, todas las isoformas necesitan del ión calcio, del fosfolípido fosfatidilserina y del segundo mensajero diacilglicerol para ser activadas. Su estructura química consiste de 4 regiones conservadas

Fig. 5 Isoformas de PKC.

La estructura de las PKCs clásicas consiste de 4 regiones (C1-C4) conservadas y 5 regiones variables (V1-V5). La región C1 (C1A-C1B), la cual tiene dedos de zinc ricos en cisteína, está involucrada en la unión al diacilglicerol (DAG) y al éster de forbol (TPA), mientras que la región C2 es la responsable de unir Ca^{2+} . Las regiones C3 y C4 son los sitios de unión al ATP y al substrato de la PKC, respectivamente. Ambos grupos de PKCs, nuevas y atípicas, tienen una región similar a C2 en V1, y las isoformas atípicas sólo tienen un dedo de zinc. Varios inhibidores selectivos, como los indolocarbazoles y las bis-indoilmaleimidias, interactúan en el sitio de unión al ATP (C3), mientras que los agentes que activan a las enzimas, como el DAG y los ésteres de forbol actúan en la región C1 (Way KJ, *et al.*, 2000).



(C1-C4) y de 5 regiones variables (V1-V5); la región C1, localizada en el extremo amino terminal de la proteína, posee dos regiones (dedos de zinc) ricas en cisteínas que forman los sitios de unión al diacilglicerol y a los ésteres de forbol. Los ésteres de forbol como el TPA (del inglés tetradecanoyl phorbol acetate) pueden substituir o mimetizar al diacilglicerol para activar a la PKC. Por otro lado el dominio C2 posee un sitio de reconocimiento a la fosfatidilserina y el sitio de unión al calcio. En los dominios C3 y C4, localizados en el extremo carboxilo terminal, se encuentran los sitios de unión al ATP y los sitios de unión a los substratos por ser fosforilados, respectivamente (Fig. 5). Del segundo grupo o PKCs nuevas (δ , ϵ , η , θ y μ , ν), todas son activadas por el diacilglicerol, por los ésteres de forbol y la fosfatidilserina. A diferencia de las isoformas convencionales, son absolutamente independientes del calcio y esto se debe a que en su dominio C2 no se encuentran los grupos funcionales que unen al calcio, por lo que la región C2 es la principal diferencia estructural que las distingue del primer grupo. Las isoformas μ (mu) y ν (nu) tienen un dominio de pleckstrina (PH) que las distingue de todas las demás isoformas de PKCs y es probable que ambas cinasas sean reguladas de manera similar; razón por la que, además de su alta homología, se considera que estas dos isoformas deberían pertenecer a una cuarta familia (Hayashi *et al.*, 1999).

En el último grupo se clasifican a las isoformas atípicas de PKCs (ζ y λ), las cuales son independientes del calcio y no necesitan del diacilglicerol o ésteres de forbol para su activación, aunque el fosfolípido fosfatidilserina sí puede regular su activación. En cuanto a su estructura, difieren mucho de los otros dos grupos, por ejemplo el dominio C1 sólo tiene una región rica en cisteínas y no dos y el dominio C2 carece de algunos residuos importantes para su plegamiento característico en las isoformas clásicas (Newton 1997; Mellor y Parker 1998).

El diacilglicerol y los ésteres de forbol, dada su naturaleza hidrofóbica, causan un incremento en la afinidad de la PKC por la membrana y por tanto ayudan a la enzima a translocarse a la membrana (Kraft *et al.*, 1983; Wolf *et al.*, 1985). Se ha sugerido que las funciones específicas de las isoformas de PKC en un determinado tipo celular se deben a las diferencias en la localización

subcelular de la cinasa. Por ejemplo, se ha observado que la PKC α y la PKC ζ se translocan del citosol a la membrana perinuclear al ser activadas, mientras que la PKC β II no sólo se transloca del citosol a la membrana perinuclear sino también a la membrana plasmática cuando es activada en miocitos cardíacos de rata (Distanik 1994).

Para algunas isoformas de PKC que no se activan por el ión calcio se ha demostrado que los fosfoinosítidos fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato y el 3,4,5-trisfosfato, que actúan como segundos mensajeros, pueden activarlas, específicamente a la PKC δ , PKC ϵ , PKC η (nuevas) y a las PKC ζ y λ (atípicas) (Nakanishi *et al.*, 1993; Wymann y Pirola 1998; Rameh y Cantley 1999).

Debido a que se ha relacionado a la actividad de la proteína cinasa C con una multiplicidad de funciones, como por ejemplo, desensibilización de los receptores de membrana, modulación de la estructura de la membrana, regulación de la transcripción, del crecimiento celular, de los procesos de aprendizaje y memoria, entre otros, resulta indispensable conocer a fondo su regulación (Newton 1995; Newton 1997). En la actualidad se sabe que la PKC es regulada por dos mecanismos principalmente, el primero consiste en la fosforilación de la PKC en residuos de serina y treonina, lo que regula el sitio activo de la enzima y su localización subcelular. Fabbro y colaboradores en 1989, demostraron por primera vez la fosforilación *in vivo* de la proteína cinasa C y que ésta después de ser sintetizada como forma inactiva (no fosforilada) con un peso molecular aparente de 74 kDa, cambiaba a una forma transitoria y fosforilada de 77 kDa y finalmente a una forma madura de 80 kDa. Más recientemente, con la ayuda de la espectrometría de masas, la secuenciación de péptidos y la mutagénesis dirigida, se ha demostrado que la fosforilación de los tres sitios (Thr del asa de activación, Thr/Ser de autofosforilación del extremo carboxilo, Ser/Thr de la zona hidrofóbica del extremo carboxilo) de todas las isoformas de PKCs (clásicas, nuevas y atípicas) es indispensable para su activación (Parekh *et al.*, 2000). Por ejemplo, tres residuos (Thr⁵⁰⁰, Thr⁶⁴¹ y Ser⁶⁶⁰) de la PKC β I son fosforilados, dos de ellos (Thr⁵⁰⁰, y Ser⁶⁶⁰) por la PDK1 y uno (Thr⁶⁴¹) por autofosforilación. La fosforilación de uno (Ser⁶⁶⁰) lleva a la autofosforilación del

otro (Thr⁶⁴¹). En este mismo trabajo observan que la fosforilación de la Ser⁶⁶⁰ es la responsable de liberar la enzima al citosol (Keranen *et al.*, 1995).

El segundo mecanismo consiste en que la unión del sustrato activa a la enzima al desplazar al pseudosustrato del sitio de unión al sustrato. El pseudosustrato es una secuencia localizada en el extremo amino terminal o región reguladora de la misma enzima, que ocupa el sitio de unión al sustrato en ausencia de éste (Newton 1995).

CINASA DE FOSFOINOSÍTIDOS (PI-3K) y PKB

Muchos de los mecanismos transduccionales activados por diferentes receptores acoplados o no a proteínas G, convergen en la activación de las enzimas llamadas cinasas de fosfoinosítidos PI-3Ks. A estas enzimas se les ha clasificado de acuerdo a sus características estructurales y con base en su regulación diferencial (Fig. 6). Como en este trabajo nos interesó estudiar si alguna cinasa de la familia de las PI-3Ks podía estar involucrada en fosforilar al receptor AT₁ al ser activado por su agonista natural, la angiotensina II, a continuación se profundizará con mayor detalle en las isoformas de PI-3Ks que pueden ser activadas por receptores acoplados a proteínas G.

A las PI-3Ks de mamíferos se les clasifica en tres familias, la mayoría de las isoformas comparten el sustrato *in vivo*, el fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PIP₂) aunque también pueden fosforilar al fosfatidilinositol (PI) y al fosfatidilinositol (4) fosfato (PIP) *in vitro*. Todas estas enzimas fosforilan en posición 3'-OH al anillo del inositol de los fosfatidilinositales. Los productos comunes son PI(3,4)P₂ / PI(3,4,5)P₃ (Vanhaesebroeck y Waterfield 1999). Algunas isoformas de las subfamilias A y B del grupo I (Fig. 6) son de especial interés ya que pueden ser activadas por los dímeros βγ de las proteínas G. Del grupo I A hay 3 isoformas p110 (α, β y δ codificadas por 3 genes distintos). Las isoformas p110 α y β están distribuidas ampliamente en distintos tejidos en mamíferos, en contraste con la isoforma p110 δ cuya expresión parece estar restringida al tejido hematopoiético. La isoforma p110 β puede ser activada por la

PI-3Ks





CLASE	Características estructurales de la Subunidad catalítica	Subunidades Catalítica / Adaptadora	Regulación
I		p110 α, β, δ p85 α p85 β p85 γ	• Cinasas de tirosina (IA)
		p110 γ p101	• Proteínas G heterotriméricas (IA y IB) • Ras (IA y IB)
II		PI-3K-C2 ? α, β, γ	?
III		Análogos de p150 Vps34p	Constitutiva ?

Fig. 6 Diferentes clases de PI-3Ks descritas en mamíferos y las características que las definen.

Se muestra la región de unión a la subunidad adaptadora ● , la región de unión a la proteína G monomérica (Ras) ⬡ , el dominio PIK (del inglés; PI kinase homology) ■■ , el dominio catalítico ■■■■ y el dominio C2 ○ (Tomado de: Vanhaesebroeck B y Waterfield MD, 1999).

proteína G monomérica Ras, por receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa y por receptores acoplados a proteínas G a través de los dímeros $\beta\gamma$. Es necesario mencionar que los receptores con actividad de tirosina cinasa activan a la PI-3K- p110 β a través de regiones homólogas a Src (SH2) en su subunidad reguladora p85, ya que en esta familia las enzimas PI-3Ks existen como complejos de subunidades catalíticas con las subunidades reguladoras o adaptadoras p85; estas últimas tienen en su estructura dominios de unión SH2 que son módulos, de aproximadamente 100 aminoácidos, que se unen específicamente a las fosfotirosinas de los receptores con actividad de cinasa u otras proteínas. En este grupo (IA) hay al menos 7 isoformas de las subunidades adaptadoras p85, generadas por la expresión y "splicing" alternativo de 3 genes diferentes: p85 α , p85 β y p85 γ (Vanhaesebroeck y Waterfield 1999).

Los receptores acoplados a proteínas G activan a la p110 β mediante los dímeros $\beta\gamma$, sin la ayuda de la subunidad p85 (Murga *et al.*, 2000), a diferencia de los receptores con actividad de tirosina cinasa como el receptor de EGF (del inglés Epidermal Growth Factor) o el receptor de PDGF (del inglés Platelet-Derived Growth Factor), los cuales activan a la subunidad catalítica p110 β por medio de los dominios SH2 de la subunidad reguladora p85.

Del grupo IB solamente se conoce a la subunidad catalítica p110 γ en complejo con la subunidad reguladora p101, cuya expresión se limita a los leucocitos de mamíferos. Los heterodímeros p110 γ / p101 son activados por los dímeros $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas o bien por las proteínas $G\alpha$ activadas, particularmente $G\alpha_q$. Se ha visto en células Cos-7 transfectadas con los receptores muscarínicos m1 y m2, los cuales se acoplan a $G\alpha_q$ y a $G\alpha_i$ respectivamente, que la subunidad p101 es indispensable para la activación de la p110 γ por los dímeros $\beta\gamma$ y por las $G\alpha_q$, promoviendo así la proliferación celular al activar a la proteína cinasa B o Akt (Murga *et al.*, 1998).

Akt / PKB deriva su nombre de su alta homología con las cinasas de serina y treonina activadas por segundos mensajeros, PKA y PKC, así como también de su alta similitud con la oncoproteína viral v-Akt. La PKB está conformada

estructuralmente por un dominio homólogo de pleckstrina (PH) en su extremo amino terminal, por un dominio de cinasa y una región reguladora en su extremo carboxilo. En general los dominios PH se encuentran en proteínas efectoras que se unen a las membranas y estos dominios PH se unen con alta afinidad (con una Kd del rango nanomolar) a los fosfoinosítidos; PI(4,5)P₂, PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃; los dos últimos fosfoinosítidos son de hecho los principales productos de la actividad de las cinasas PI-3Ks y ambos productos activan directamente a la Akt / PKB a través de su dominio homólogo de pleckstrina (Franke *et al.*, 1997a; Klippel *et al.*, 1997). También se ha reportado que la región carboxilo-terminal de algunos dominios PH se une a los dímeros $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas (Koch *et al.*, 1993).

En lo que respecta a la activación de la PKB, ya se conoce que dos sitios específicos, uno en el dominio de cinasa (Treonina³⁰⁸) y otro en el extremo carboxilo-terminal (Serina⁴⁷³), requieren ser fosforilados para que esta cinasa sea completamente activada. En la búsqueda de la cinasa responsable de fosforilar estos dos aminoácidos, se encontró que la PDK1 (del inglés 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1) fosforila la treonina 308 de manera dependiente del PI(3,4)P₂ y del PI(3,4,5)P₃. Estudios recientes sugieren que la serina⁴⁷³ de la Akt / PKB es fosforilada por la PDK2 y se sugiere también que esta cinasa es la misma PDK1 pero en complejo con la cinasa PRK2 (del inglés PKC-related kinase) (Vanhaesebroeck B y Waterfield MD, 1999). Cabe mencionar que la cinasa PDK1 también posee un dominio PH en su estructura, que esta cinasa activa a la PKB al fosforilar ambos residuos (Treonina³⁰⁸ y Serina⁴⁷³) lo que hace de manera dependiente de los fosfoinosítidos PIP₂ / PIP₃ y además que esta cinasa no solamente puede fosforilar a la PKB, sino también puede fosforilar residuos conservados en otras cinasas de serina y treonina, como la proteína cinasa dependiente del AMPc o bien PKA (Cheng X, *et al.*, 1998) y algunas isoformas de PKC, específicamente la PKC ζ y la PKC δ . Estas isoformas son fosforiladas en sus asas de activación por la PDK1 *in vitro* y de una manera dependiente de la actividad de PI-3K *in vivo*, al unir con alta afinidad al PIP₃ (Le Good *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1998).

Dado el efecto proliferativo o anti-apoptótico de la PKB, se sugiere que cuando se sobre-expresa esta cinasa juega un papel importante en diferentes tipos de cáncer, como el de páncreas, el de ovario y el de glándulas mamarias (Franke *et al.*, 1997b; Downward 1998). El que una señal determinada induzca proliferación, diferenciación o muerte celular, depende del tipo celular y está finamente regulado por la expresión génica y por cascadas de activación de diversas enzimas como cinasas, proteasas, etc.

Existen muchas enfermedades en las que las células mueren prematuramente, por ejemplo en un infarto del corazón, algunas células mueren tanto por necrosis como por apoptosis. Una posible terapia para algunas enfermedades se basa en evitar la muerte celular por apoptosis, para lo cual se está buscando una droga adecuada que evite esta muerte celular y de hecho se ha encontrado que algunos inhibidores de caspasas son efectivos en modelos animales de infarto, de enfermedades del hígado y lesiones traumáticas del cerebro (Thornberry y Lazebnik 1998). En este mismo sentido se ha visto que algunos virus inducen la expresión de algunas proteínas "anti-apoptóticas" que son efectivas en detener la muerte celular programada al unirse a algunas proteasas denominadas "caspasas" e inhibir su actividad de proteasa, con lo cual protegen a la célula huésped para poderla infectar y multiplicarse en ella.

La muerte celular programada o apoptosis se considera como un proceso activo de auto-destrucción celular genéticamente programada, a diferencia de la necrosis, que se considera un proceso esencialmente accidental y que ocurre generalmente a consecuencia de un severo daño celular (Kerr y Harmon 1991). La muerte celular programada puede ser iniciada por una gran variedad de estímulos, incluyendo la presencia o ausencia de factores de crecimiento, alteraciones en el ciclo celular y algunos tipos de estrés. Existen tres vías principales de señalización apoptótica. Una de ellas es mediante la interacción de receptores de membrana con sus respectivos ligandos, los cuales, a través de moléculas adaptadoras pueden reclutar y activar a algunas proteasas (caspasas). La segunda vía de señalización es iniciada por la ausencia o eliminación de factores de crecimiento y es regulada por la familia de proteínas Bcl-2, como Bcl-x

y Bad, las cuales al interactuar entre sí, inducen o no la liberación del citocromo c y de AIF (del inglés apoptosis-inducing factor) de la mitocondria (Petit *et al.*, 1998) y posterior activación de la proteína de 130 kD o Apaf-1 y de la cascada de caspasas (Zou *et al.*, 1997). La tercera vía es iniciada por el daño al ADN por una desoxiribonucleasa activada por una caspasa, CAD (del inglés caspase-activated deoxyribonuclease), y la activación secuencial de algunas caspasas (Enari *et al.*, 1998).

La familia de Bcl-2 está compuesta por al menos 15 proteínas descritas hasta la fecha en mamíferos. Los miembros de esta familia se dividen en proteínas anti-apoptóticas muy relacionadas estructuralmente a Bcl-2 (Bcl-x, Mcl-1, A1, etc) y proteínas pro-apoptóticas (Bak, Bax, Bad, Blk, etc). Todos los miembros de esta familia tienen la capacidad de formar dímeros mediante la interacción del dominio estructural BH característico de esta familia, el dominio homólogo a Bcl-2 (Adams y Cory 1998).

El estudio de los efectos anti-apoptóticos de la Akt / PKB, producidos en diferentes modelos celulares en condiciones de sobre-expresión de esta cinasa, llevó a diversos grupos de investigación a tratar de identificar los substratos de la PKB. Así se encontró que la proteína pro-apoptótica Bad es fosforilada por la PKB en la Serina¹³⁶ (Fig. 7) (Downward 1999), una vez que Bad ha sido fosforilada por la PKB ya no se puede unir a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x; de esta manera Bcl-2 y/o Bcl-x ya pueden ejercer su efecto inhibitor del proceso apoptótico en ausencia de Bad. También se ha demostrado que la caspasa-9 (Cardone *et al.*, 1998) y algunos factores transcripcionales (FKHR, FKHL1) de la familia FH (del inglés fork-head) son fosforilados e inhibidos por la PKB (Fig. 7) (Brunet *et al.*, 1999; Kops *et al.*, 1999; Biggs *et al.*, 1999). Estos factores transcripcionales al ser fosforilados ya no se translocan al núcleo y por lo tanto ya no inducen la transcripción de algunos genes como el que codifica para el ligando Fas, el cual promueve apoptosis a través de su receptor de membrana CD95.

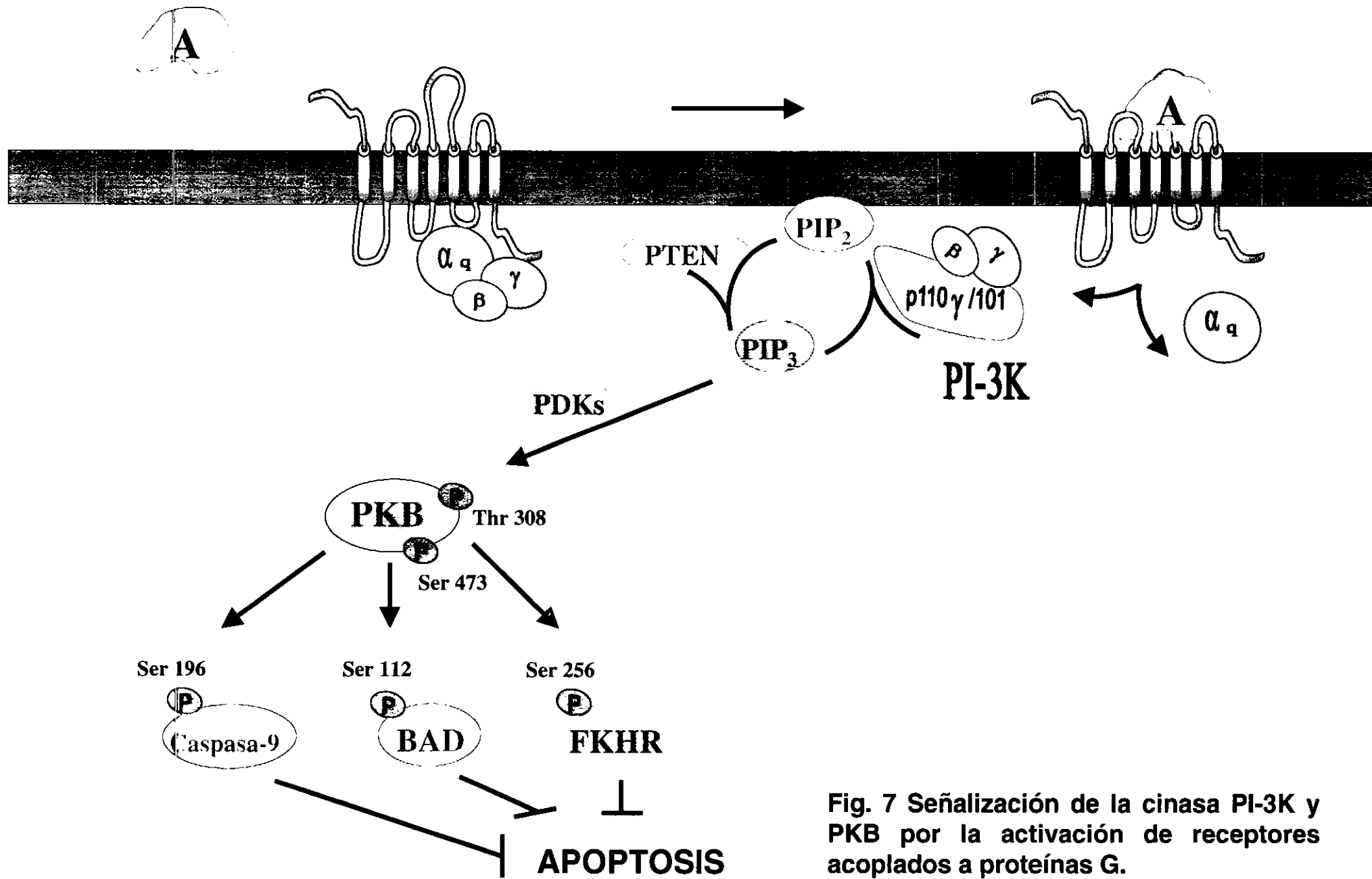


Fig. 7 Señalización de la cinasa PI-3K y PKB por la activación de receptores acoplados a proteínas G.

Fig. 7

Señalización de la cinasa PI-3K y PKB por la activación de receptores acoplados a proteínas G.

En el esquema se muestra la secuencia de activación de la PI-3K / PKB por los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. **A**, agonista; α_q , subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica; $\beta\gamma$, dímeros beta-gamma de las proteínas G heterotriméricas; **PI-3K (p110 γ /101)**, cinasa de fosfoinosítidos; **PIP₂**, fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato; **PIP₃**, fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato; **PTEN**, fosfatasa de fosfoinosítidos; **PDKs**, cinasas dependientes de fosfoinosítidos; **PKB**, proteína cinasa B; **Caspasa 9**, proteasa; **BAD**, proteína pro-apoptótica; **FKHR**, factor transcripcional de la familia "Fork-Head".

ANTECEDENTES

Los antecedentes más importantes de este trabajo, que fundamentan los objetivos planteados más adelante, son los siguientes:

Dado el conocimiento obtenido a partir del estudio de diversos receptores de membrana acoplados a proteínas G, actualmente se acepta que la fosforilación del receptor es un mecanismo de regulación de la cascada transduccional activada por el receptor. Por ejemplo, en el caso de la desensibilización homóloga, en la que sólo los receptores activados por su agonista disminuyen su capacidad de responder o de activar las cascadas transduccionales a las que están acoplados, los receptores son en su mayoría fosforilados por las cinasas GRKs (Ferguson *et al.*, 1997). Mientras que en el proceso de desensibilización heteróloga, los receptores son fosforilados preferencialmente por cinasas activadas por segundos mensajeros como la PKC y la PKA (Clark *et al.*, 1988; Houslay 1991), o bien por receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa (Hadcock *et al.*, 1992).

Como ya se mencionó en la introducción, se ha observado la disminución de la respuesta de los receptores AT₁ por la exposición prolongada a la angiotensina II o a los ésteres de forbol en diversos tipos celulares (Abdellatif *et al.*, 1991; Boulay *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1995; Oppermann *et al.*, 1996; Balmforth *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1998); sin embargo, aún no es claro por lo menos para las cinasas activadas por segundos mensajeros si éstas participan en la desensibilización homóloga y / o heteróloga del receptor.

Por otro lado, la evidencia experimental que se tenía hasta antes de iniciarse este trabajo de las cinasas que fosforilan al receptor AT₁ se presenta a continuación:

Se observó la fosforilación del receptor AT_{1A} inducida por la angiotensina II, el éster de forbol (PMA), la forskolina (activador de la adenilil ciclase) y el dbAMPc en células HEK-293 transfectadas transitoriamente (Oppermann *et al.*, 1996). En este mismo trabajo también se demuestra la fosforilación del receptor AT_{1A} por las

cinastas GRKs en respuesta al agonista, específicamente las GRK2, GRK3 y GRK5, en células HEK-293 co-transfectadas.

La fosforilación del receptor AT₁ inducida por la angiotensina II, el TPA y la forskolina en células de la zona glomerular adrenal de bovino fue la primera evidencia experimental de fosforilación de un receptor de angiotensina II que se expresa endógenamente (Smith *et al.*, 1998a).

La fosforilación del receptor AT_{1A} parece estar restringida al extremo carboxilo terminal del receptor, en una región rica en serinas y treoninas (un segmento de 11 residuos; Ser³²⁶-Thr³³⁶). El receptor truncado a partir de la Ser³²⁶, ya no es sustrato de fosforilación en células COS-7 transfectadas transitoriamente (Smith *et al.*, 1998b).

Se han identificado algunos sitios de fosforilación del receptor AT_{1A} silvestre en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el receptor (Qian *et al.*, 1999). Los receptores mutados en la Ser³³¹, Ser³³⁸ y Ser³⁴⁸ disminuyen un 22%, 52% y 47%, respectivamente, la fosforilación inducida por la angiotensina II, cuando se le compara con el receptor silvestre o no mutado. Sólo el receptor triple mutante disminuye hasta un 60% el efecto de angiotensina II y un 70% el de PMA, lo cual sugiere que aún existen otros sitios que son fosforilados por ambos agentes.

Por último, con trabajo previo realizado en el laboratorio se demostró la participación de la PI-3K en la fosforilación del receptor α 1b-adrenérgico inducida por el ácido lisofosfatídico en fibroblastos de rata (Casas-González *et al.*, 2000).

HIPOTESIS

Si el receptor de angiotensina AT₁ presente en las células C9 se fosforila en respuesta a la angiotensina II así como a otras hormonas, las respuestas que activa el receptor se desensibilizarán.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la desensibilización y fosforilación del receptor de angiotensina AT₁ endógeno en las células C9 epiteliales de hígado de rata.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar si el receptor AT₁ endógeno que se expresa en las células epiteliales de hígado de rata (C9) se desensibiliza de manera homóloga y / o heteróloga.
- Determinar qué cinasa(s) fosforila(n) al receptor AT₁ en respuesta a su agonista endógeno, la angiotensina II.
- Establecer si la fosforilación del receptor AT₁ inducida por la angiotensina II es mediada a través de proteínas G sensibles (G_i, G_o) y / o insensibles a la toxina de Pertussis (G_q).
- Determinar si el receptor AT₁ endógeno es fosforilado de manera heteróloga por la activación de otros receptores acoplados también a proteínas G, como los receptores de vasopresina, del ácido lisofosfatídico y conocer las cinasas involucradas en la fosforilación del receptor.

Las metodologías empleadas en este trabajo así como los resultados obtenidos están descritos en detalle en el artículo:

García-Caballero A, Olivares-Reyes JA, Catt KJ and Gacía-Sáinz JA (2001) Angiotensin AT₁ Receptor Phosphorylation and Desensitization in a Hepatic Cell Line. Roles of Protein Kinase C and Phosphoinositide 3-Kinase. *Molecular Pharmacology*. **59**:576-585.

Este artículo se incluye en la sección de los resultados, que se resumen a continuación.

RESUMEN DE RESULTADOS

Validación del modelo.

Debido a que en los hepatocitos en cultivo primario se disminuye su capacidad para responder a la angiotensina II a causa de una muy marcada disminución en la densidad de la población de receptores (Bouscarel *et al.*, 1990), nos interesó estudiar alguna línea celular hepática que expresara receptores de angiotensina II y que además fueran funcionales. La clona 9 (C9) es una línea celular epitelial aislada de hígado normal de rata Sprague-Dowley que se ha observado, por ensayos de "binding" o de asociación de un ligando marcado radioactivamente con el receptor (Kozlowski *et al.*, 1993) además de ensayos funcionales (García-Sáinz y García-Caballero 1998), que expresa receptores de angiotensina II. En un trabajo previo, habíamos observado que la activación de los receptores AT₁ en las células C9 induce el aumento en la producción de los fosfatos de inositol IP₁, IP₂ e IP₃ así como el aumento en la liberación del calcio de los reservorios intracelulares y en la expresión del RNAm de *c-fos* (García-Sáinz y García-Caballero 1998).

Desensibilización homóloga.

En las células epiteliales de hígado de rata C9, el receptor AT₁ endógeno muestra una clara disminución en su capacidad de inducir la liberación de calcio de reservorios intracelulares en respuesta al agonista cuando se pre-estimulan las células con la angiotensina II (Fig. 1, pag. 578 del artículo). La desensibilización mostró dependencia de la concentración del estímulo inicial o primer estímulo (Fig. 1B, pag. 578 del artículo), con una EC₅₀: 2 nM.

Estos resultados demuestran que el receptor AT₁ que se expresa en las células "C9" se desensibiliza de manera homóloga, es decir por su propio agonista, la angiotensina II.

Desensibilización heteróloga.

La liberación de calcio inducida por 100 nM de angiotensina II es menor cuando las células C9 son pretratadas con TPA 1 μM y dbAMPC 100 μM, activadores de la PKC y de la PKA, respectivamente (Fig. 2B, pag. 579 del artículo). El curso temporal del efecto de ambos agentes sobre la liberación de calcio intracelular inducida por la angiotensina II, muestra una disminución parcial desde los primeros minutos (Fig. 2A, pag. 579 del artículo).

La estimulación inicial con el ácido lisofosfatídico 1 μM y la vasopresina 10 nM reduce la respuesta de calcio inducida posteriormente por la angiotensina II 100 nM (Fig. 3 del artículo).

Estos resultados demuestran que el receptor AT₁ también se desensibiliza de manera heteróloga por el ácido lisofosfatídico y la vasopresina y que las proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros, PKC y PKA, participan en la desensibilización temprana del receptor.

Fosforilación homóloga.

La fosforilación del receptor AT₁ mostró ser dependiente de la concentración de angiotensina II, la curva obtenida muestra un valor de la EC₅₀ de 0.4 nM (Fig. 5A, pag. 580 del artículo). Esta fosforilación homóloga es bloqueada parcialmente por el inhibidor específico de la PKC (bisindolilmaleimida I) (Fig. 5, pag. 581 del artículo) y por los inhibidores de la PI-3K (wortmanina y LY294002) (Fig. 7A, 7B, pag. 581 del artículo). El efecto de los inhibidores de la cinasa de fosfoinosítidos mostró ser también dependiente de la concentración, con un valor de 8 nM para la IC₅₀ de la wortmanina y de 125 nM para la IC₅₀ del LY294002 (Fig. 7B, pag. 581 del artículo).

La fosforilación de la Akt / PKB, que es un reflejo de la activación de la PI-3K, fue inducida por la angiotensina II y se observó una dosis y tiempo máximos con 1 μM de la hormona a los 5 minutos de estimulación (Fig. 10A, 10B, pag. 583 del artículo). La fosforilación de la PKB fue bloqueada en su totalidad por los inhibidores de la PI-3K y por el antagonista selectivo del receptor AT₁ (Losartan) (Fig. 10C, pag. 583 del artículo).

La asociación de la PKC δ a la membrana fue estimulada significativamente por el octapéptido, angiotensina II e inhibida parcialmente por el inhibidor bisindolilmaleimida (Fig.10D, pag. 583 del artículo).

La fosforilación homóloga del receptor inducida por la angiotensina II fue bloqueada parcialmente (50%) por el pretratamiento de las células con 100 ng / ml de la toxina de Pertussis (Fig. 8, pag. 582 del artículo).

En conjunto, estos resultados sugieren la participación de proteínas G sensibles e insensibles a la toxina de Pertussis en la fosforilación del receptor AT₁ inducida por angiotensina II, así como la participación de la proteína cinasa C y de la PI-3K mediante la activación de la Akt / PKB.

Fosforilación heteróloga.

Se observó la fosforilación heteróloga y temprana del receptor AT₁ causada por la activación de otros receptores de membrana acoplados a proteínas G (receptores de vasopresina y del ácido lisofosfatídico) (Fig. 9, pag 583 del artículo) y por los activadores (TPA: Fig. 5B, 5C y 6 pag. 580-581 del artículo; dbAMPc: Fig. 9, pag. 583 del artículo) de las cinasas activadas por los segundos mensajeros, PKC y PKA.

La fosforilación causada por el LPA 1 μM y la vasopresina 10 nM fue mediada principalmente por la PKC (Fig. 9, pag. 583 del artículo) ya que se inhibió significativamente en ambos casos por el inhibidor específico de la PKC, bisindolilmaleimida 1 μM (BIM). El grado de fosforilación del receptor inducido por cualquiera de los agentes utilizados alcanzó la mitad del efecto inducido por la angiotensina II 100 nM. Sólo cuando se estimuló a las células con el TPA y la angiotensina II juntos se observó un efecto aditivo de ambos agentes sobre la fosforilación del receptor (Fig. 5C, pag. 580 del artículo).

RESULTADOS NO PUBLICADOS

De la fosforilación homóloga del receptor AT₁ nos interesó estudiar las isoformas de PKC que pudieran ser activadas por la angiotensina II y observamos un incremento en la translocación de la PKC δ a la membrana inducida por el agonista, como ya se mencionó en el resumen de los resultados publicados. También observamos un incremento en la translocación de la PKC α a la membrana inducida por el éster de forbol (TPA), pero no por la angiotensina II a los 5 minutos de estimulación (Fig. 1); entonces, podemos sugerir la participación de esta isoforma en la fosforilación (heteróloga) del receptor AT₁ inducida por el TPA. Cabe mencionar que no se detectó la presencia de las isoformas, β II, θ y ζ , por ensayos de "Western-Blot" en las preparaciones de membranas de las células C9 a los 5 minutos de estimulación de las células con la angiotensina II.

De la participación de otras cinasas, diferentes de la PKC y PI-3K, en la fosforilación del receptor AT₁ en las células C9, pensamos que alguna cinasa de la familia de las GRKs pudiera también fosforilar al receptor. Mediante ensayos de "Western-Blot", observamos la expresión de la cinasa GRK5 en extractos totales de las células C9 (Fig. 2).

Por otra parte, se estudió la posibilidad de que las proteínas G sensibles a la toxina de pertussis mediaran el efecto de la PI-3K y la PKC en la fosforilación del receptor AT₁ (Fig. 3); sin embargo, no se observó modificación alguna en los efectos de ambos inhibidores (wortmanina y bisindolilmaleimida I) sobre la fosforilación del receptor inducida por la angiotensina II en células pretratadas con la toxina.

Acerca de la comunicación cruzada o "cross-talk" entre receptores, también observamos que el receptor de angiotensina II AT₁ puede ser fosforilado por la activación del receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Fig. 4). Actualmente estamos realizando experimentos para conocer la(s) cinasa(s) que fosforila(n) al receptor AT₁ en respuesta a la activación del receptor de EGF.

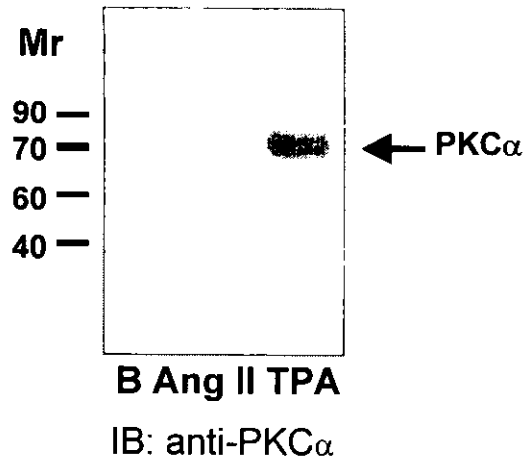


Fig. 1 Translocación de la PKC α a la membrana por el TPA. Las células se incubaron en ausencia o presencia de la angiotensina II 100 nM durante 5 min y del TPA 1 μ M durante 5 minutos. Se obtuvieron membranas celulares, se procesaron las muestras por electroforesis (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas y se realizaron ensayos de "Western-Blot" revelando por quimioluminiscencia. Se muestra un experimento representativo de 3-4 experimentos.

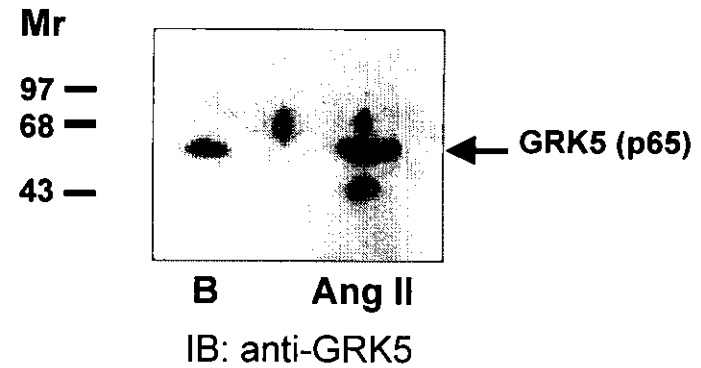


Fig. 2 Expresión de la cinasa GRK5 en las células C9. Se realizaron ensayos de "Western-Blot" en muestras de extractos totales de las células C9 epiteliales de hígado de rata, estimuladas o no con angiotensina II 100 nM durante 5 minutos. Se muestra un experimento representativo de 3-4 experimentos.

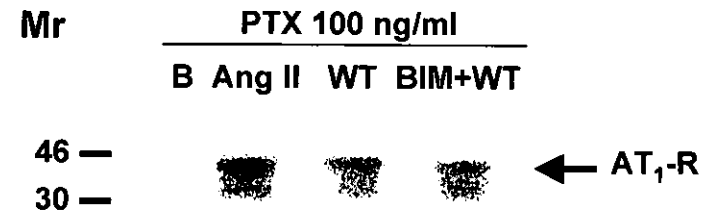


Fig. 3 Efecto de la toxina pertussis y los inhibidores de PKC y PI-3K en la fosforilación del receptor AT $_1$.

El receptor AT $_1$ fosforilado se inmunoprecipitó como se indica en materiales y métodos del artículo (pag. 577). Las células se preincubaron de 12 a 24 horas con la toxina pertussis (100 ng/ml) y el día del experimento las células se preincubaron o no durante 30 minutos con los inhibidores de cinasas previamente a la estimulación con la angiotensina II 100 nM.

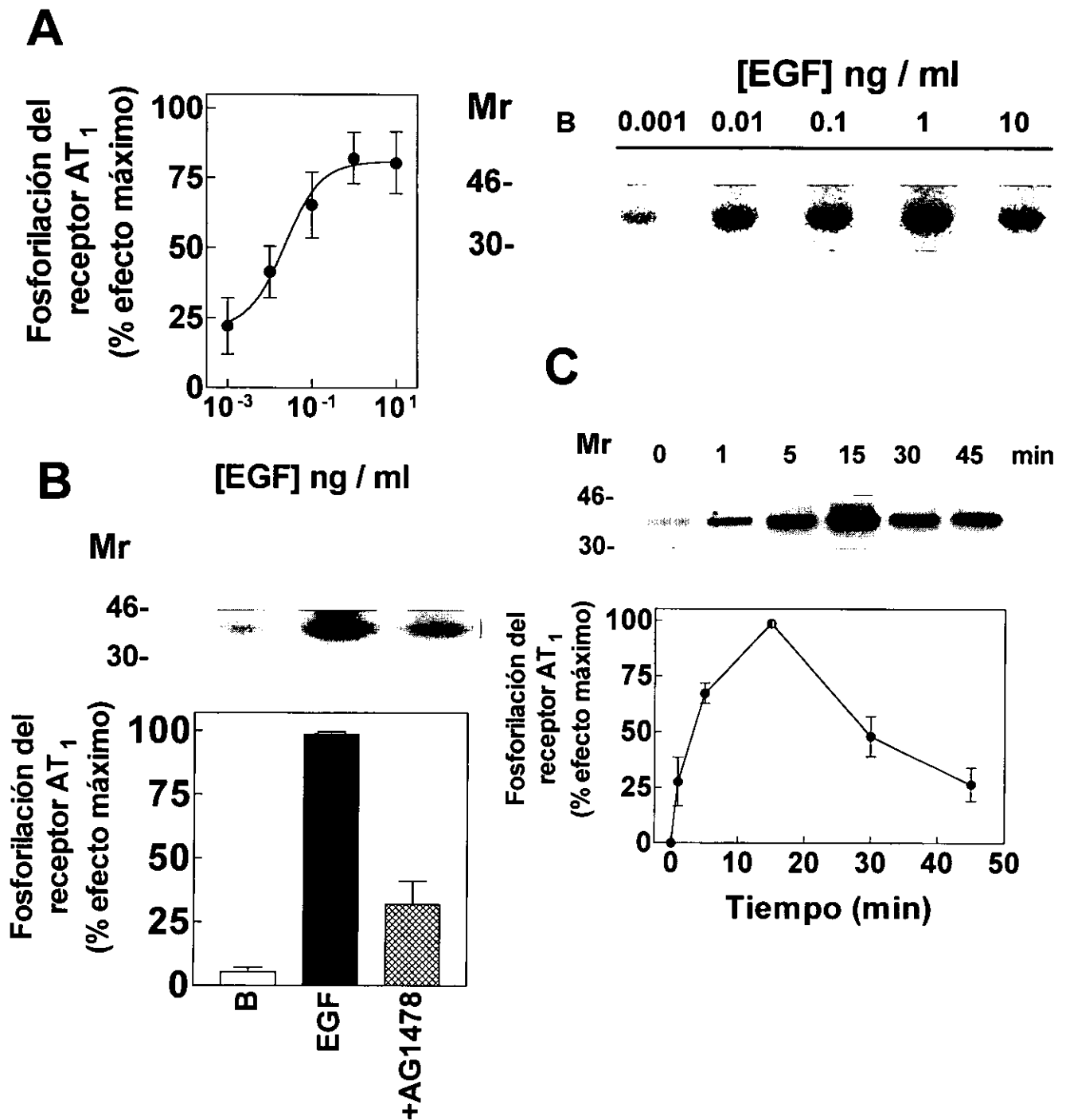
Fig. 4

Fosforilación del receptor AT₁ por el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Panel A; Curva dosis-respuesta
Las células "C9" se estimularon con las concentraciones indicadas de EGF durante 5 minutos. Se muestra el promedio y el error estándar de 5-6 experimentos.

Panel B; Efecto del inhibidor de la actividad de cinasa del receptor a EGF. Las células se preincubaron con 5 μ M del inhibidor (AG1478) durante 30 min y se estimularon con 1 ng / ml de EGF durante 5 min.

Panel C; Curso temporal del efecto del EGF en la fosforilación del receptor AT₁. Las células se estimularon con 1 ng / ml de EGF. Se muestra el promedio y el error estándar de 5-6 experimentos.



Angiotensin AT₁ Receptor Phosphorylation and Desensitization in a Hepatic Cell Line. Roles of Protein Kinase C and Phosphoinositide 3-Kinase

AGUSTÍN GARCÍA-CABALLERO, J. ALBERTO OLIVARES-REYES, KEVIN J. CATT, and J. ADOLFO GARCÍA-SAÍNIZ

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México (A.G.-C., J.A.G.-S.); and Endocrinology and Reproduction Research Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (A.O.-R., K.J.C.)

Received July 21, 2000; accepted November 30, 2000

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

ABSTRACT

Desensitization and phosphorylation of the endogenous angiotensin II AT₁ receptor were studied in clone 9 liver cells. Agonist activation of AT₁ receptors blunted the response to subsequent addition of angiotensin II. Partial inhibition of the angiotensin II-induced calcium response was observed when cells were pretreated with dibutyryl cyclic AMP, tetradecanoyl phorbol acetate (TPA), vasopressin, or lysophosphatidic acid. All of these desensitization processes were associated with receptor phosphorylation. Angiotensin II-induced AT₁ receptor phosphorylation was partially blocked by the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I and by phosphoinositide 3-kinase inhibitors (wortmannin and LY294002); the actions of these inhibitors were not additive. Pertussis toxin pretreatment of cells also partially inhibited angiotensin II-induced AT₁ receptor

phosphorylation. TPA-induced AT₁ receptor phosphorylation was completely blocked by bisindolylmaleimide I. AT₁ receptor phosphorylation was also induced by vasopressin and lysophosphatidic acid, and these effects were partially inhibited by bisindolylmaleimide I. Angiotensin II increased Akt/PKB (protein kinase B) phosphorylation and protein kinase C membrane association. The effect on Akt/PKB phosphorylation was blocked by phosphoinositide 3-kinase inhibitors. These findings indicate that clone 9 cells exhibit both homologous and heterologous desensitization in association with AT₁ receptor phosphorylation. In these hepatic cells, angiotensin II-induced receptor phosphorylation involves pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins, and is mediated in part through protein kinase C and phosphoinositide 3-kinase.

The pressor octapeptide angiotensin II (Ang II) mediates a plethora of physiological processes in the cardiovascular system, brain, liver, kidney, adrenal glands, and pituitary gland, as well as in many other organs and systems (Jackson and Garrison, 1996). The actions of Ang II are initiated through its interaction with two seven-transmembrane domain receptors, the AT₁ and AT₂ receptor subtypes (Inagami et al., 1994).

AT₁ receptors (AT₁-Rs) mediate most of the known actions of Ang II, and they are GPCRs that activate phosphoinositide/Ca²⁺ signaling via pertussis toxin-insensitive G proteins. In some cell types, they are also coupled to other phospholipases and to inhibition of adenylyl cyclase via pertussis toxin-sensitive G proteins (García-Sáinz and Macías-Silva, 1990; Bauer et al., 1991). AT₁-Rs are integral membrane proteins (Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991) and

have a molecular mass of ~41 kDa. The intracellular carboxyl terminus (residues 305–359) of the AT₁-R contains numerous serine and threonine residues, some of which have been implicated in receptor activation and regulation (Hunyady et al., 1994; Thomas et al., 1995; Smith et al., 1998a; Thomas, 1998).

As with many other GPCRs, AT₁-Rs are subject to several forms of regulation. Desensitization of GPCRs is frequently associated with their covalent modification, typically by phosphorylation, which uncouples them from G proteins and initiates their internalization and recycling. Desensitization of AT₁-R-mediated signaling has been observed in cells transfected with cloned AT₁-Rs (Tang et al., 1995; Oppermann et al., 1996; Balmforth et al., 1997; Tang et al., 1998) and in cells that endogenously express them (Abdellatif et al., 1991; Boulay et al., 1994). AT₁-R phosphorylation by GRKs seems to be a major mechanism in homologous desensitization (Oppermann et al., 1996), whereas receptor phosphorylation by

This research was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (27569N).

ABBREVIATIONS: Ang II, angiotensin II; AT₁-R, angiotensin AT₁ receptor; TPA, tetradecanoyl phorbol acetate; PKC and PKA, protein kinases C and A; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; GPCR, G protein-coupled receptor; GRK, G protein-coupled receptor kinase; C9, clone 9; [Ca²⁺]_i, intracellular calcium concentration; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PDK, phosphoinositide-dependent protein kinase; EGF, epidermal growth factor.

PKA and PKC appears to participate in heterologous desensitization. The carboxyl terminus region of AT₁-Rs contains an 11-amino acid serine/threonine-rich segment (Ser³²⁶-Thr³³⁶) that is phosphorylated in response to Ang II (Smith et al., 1998b). This segment has one putative PKC phosphorylation site at Ser³³¹ and possibly a GRK phosphorylation site at Ser³³⁵ and/or Thr³³⁶. Substitution of Ser³³⁵ and Thr³³⁶ in this segment by alanine not only impairs phosphorylation of the mutant receptor but also affects the receptor internalization process (Smith et al., 1998b). More recently, Qian et al. (1999) observed that mutation of the three putative PKC consensus sites (Ser³³¹, Ser³³⁸, and Ser³⁴⁸) of the AT₁ receptor caused a 70% reduction of PKC-mediated phosphorylation and a 60% reduction in Ang II-induced phosphorylation. In bovine adrenal glomerulosa cells, agonist-dependent phosphorylation of the endogenous AT₁-Rs, as well as receptor phosphorylation induced by activation of PKA and PKC, have been observed (Smith et al., 1998a).

Ang II is a modulator of hepatic metabolism, and its receptors and signaling have been extensively studied in isolated liver cells (García-Sáinz and Macías-Silva, 1990; Bauer et al., 1991). However, normal hepatocytes lose their ability to respond to Ang II due to a marked decrease in receptor density during culture (Bouscarel et al., 1990). In contrast, the clone 9 (C9) epithelial cell line isolated from normal rat liver has been found to express AT₁-Rs as detected by functional and binding studies (Kozłowski et al., 1993; García-Sáinz et al., 1998). Activation of AT₁-Rs in C9 cells induces phosphoinositide turnover via pertussis toxin-insensitive G proteins, with increased [Ca²⁺]_i and *c-fos* mRNA expression (García-Sáinz et al., 1998). In the present study, we observed that AT₁-R-mediated [Ca²⁺]_i responses in C9 cells exhibit both homologous and heterologous forms of desensitization that are associated with receptor phosphorylation. In addition, our studies also revealed that the AT₁-R phosphorylation induced by Ang II involved pertussis toxin-sensitive G proteins as well as PI3K and PKC activities.

Experimental Procedures

Materials. EGF, F-12K nutrient mixture (Kaighn's modification), phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium, medium 199, fetal bovine serum, trypsin, and antibiotic/antimycotic solutions were from Life Technologies (Gaithersburg, MD) or Biofluids (Rockville, MD). Ang II, TPA, protease inhibitors, and all other analytical grade chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Protein A-agarose, wortmannin, LY294002, bisindolylmaleimide I, okadaic acid, protease inhibitors, pepstatin A, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, and benzamidine were all from Calbiochem (San Diego, CA). Losartan (DuP 753) and PD123177 were generous gifts from DuPont (Wilmington, DE). [¹²⁵I]-[Sar¹,(4-N₃)Phe⁸]angiotensin II was from Covance Laboratories (Vienna, VA). [³²P]P_i (8500–9120 Ci/mmol) was from NEN Life Science Products (Boston, MA). Recombinant *N*-glycosidase F (*N*-glycanase) (EC 3.5.1.52) was from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany) and from Glyco (Heyford, UK). Fura-2/acetoxymethyl ester was from Molecular Probes (Eugene, OR). Pertussis toxin was purified from vaccine concentrates (Sekura et al., 1983; García-Sáinz et al., 1992). The C9 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Rabbit polyclonal anti-PKC δ antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-phospho-Akt/PKB antibodies were from PharMingen (San Diego, CA), and secondary antibodies and the chemiluminescence kits were obtained from Pierce (Rockford, IL).

Cell Culture. C9 cells were cultured in F-12K medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B at 37°C under a 95% air/5% CO₂ atmosphere. Cells were incubated with pertussis toxin (100 ng/ml) for 12 to 24 h where indicated.

Intracellular Calcium Measurements. To quantify [Ca²⁺]_i, cells were loaded with 5 μ M Fura-2/acetoxymethyl ester in Krebs-Ringer-HEPES buffer (118 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4) containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4, for 1 h at 37°C. Cells were detached by gentle trypsinization. Fluorescence measurements were carried out with an Aminco-Bowman (Urbana, IL) series 2 spectrometer 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 intracellular calcium concentration was calculated according to the method of Grynkiewicz et al. (1985), using software provided by Aminco-Bowman; traces were directly exported to the graphs.

Immunoprecipitation of Photoaffinity-Labeled AT₁-Rs. Confluent C9 cells cultured in 10-cm dishes were washed three times with ice-cold medium 199 before overnight incubation at 4°C in the same medium containing the photoaffinity ligand, [¹²⁵I]-[Sar¹,(4-N₃)Phe⁸]Ang II. Cells were then washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline and exposed to UV light for 10 s. Noncovalently bound [¹²⁵I]-azido-Ang II was removed by incubating the cells for 10 min in ice-cold 150 mM NaCl containing 50 mM acetic acid. After further washes with ice-cold phosphate-buffered saline, dishes were drained and the cells were scraped into lysis buffer [50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 5 mM EDTA, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml benzamidine, 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, and 1 μ M okadaic acid] and probe-sonicated (Sonifier Cell Disruptor; Heat Systems Ultrasonics, Plainview, NY) for 2 \times 20 s. After removal of nuclei by centrifugation for 10 min at 750g, membranes were collected by centrifugation for 45 min at 200,000g. Membrane pellets were solubilized by Dounce homogenization in ice-cold lysis buffer B [lysis buffer supplemented with 1% (v/v) Nonidet P-40, 1% (w/v) sodium deoxycholate, and 0.1% (w/v) SDS]. After centrifugation for 10 min at 10,000g, solubilized membranes were incubated for 4 h at 4°C with 2% (v/v) protein A-agarose. This precleared supernatant was then divided into aliquots and stored at -20°C before use. Immunoprecipitation was initiated by adding 5 μ l of a selective anti-AT₁-R antibody and 2% (v/v) protein A-agarose overnight at 4°C with tumbling. The preparation and characteristics of the rabbit anti-AT₁-R polyclonal antibody are described in detail elsewhere (Smith et al., 1998a). Immune complexes were collected by centrifugation and washed three times with ice-cold lysis buffer B lacking protease inhibitors. After the final wash, immune complexes were eluted into Laemmli's sample buffer (Laemmli, 1970) for 1 h at 48°C. After resolution by SDS-PAGE (8–16% resolving gel), photoaffinity-labeled AT₁-Rs were visualized using a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA).

AT₁-R Phosphorylation Assay. C9 cells cultured in 10-cm Petri dishes were metabolically labeled for 4 h at 37°C in phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 100 μ Ci/ml [³²P]P_i. After three washes in Krebs-Ringer-HEPES buffer, cells were further incubated in the same medium for 10 min at 37°C in a water bath and stimulated with hormones or phorbol 12-myristate 13-acetate for an additional 5-min period. This time was selected on the basis of preliminary experiments. When required, the PKC inhibitor, bisindolylmaleimide I (1 μ M), or the PI3K inhibitors, LY294002 (15 μ M) or wortmannin (100 nM), were added for 30 min at 37°C prior to the agonist stimulation. After stimulation, the plates were washed with ice-cold phosphate-buffered saline, and the cells were drained before being scraped into lysis buffer and probe-sonicated for 2 \times 20 s. After removal of nuclei at 750g, membranes were pre-extracted by the addition of an equal volume of lysis buffer containing 2 M

NaCl and 8 M urea followed by overnight tumbling at 4°C. The membranes then were collected at 200,000g and solubilized in lysis buffer B by Dounce homogenization. After centrifugation at 14,000g, solubilized membranes were incubated with 2% (v/v) protein A-agarose for 1 h at 4°C. The precleared supernatant was incubated overnight at 37°C with 10 units/ml recombinant *N*-glycosidase F. The deglycosylated AT₁-R was immunoprecipitated by the addition of 1 µl of anti-AT₁ antibody and 2% (v/v) protein A-agarose and incubated overnight at 4°C. The agarose-bound immune complexes were washed with lysis buffer B lacking protease inhibitors, Laemmli's sample buffer was added, and the mixtures were incubated for 1 h at 48°C. The denatured complexes were resolved by SDS-PAGE on an 8 to 16% gradient resolving gel. Phosphorylated AT₁-Rs were visualized with a PhosphorImager and images were exported to the graphs. The level of receptor phosphorylation was assessed in the gels with the PhosphorImager ImageQuant software.

Akt/PKB and PKCδ Assays. Subconfluent C9 cells, in 6-well plates, were switched to serum-free medium overnight (16–18 h) and were stimulated. After three washes with ice-cold phosphate-buffered saline, cells were drained, scraped into 0.1 ml of Laemmli's sample buffer (Laemmli, 1970), and sonicated for 5 s. After boiling for 5 min, equal quantities of cell lysates were subjected to SDS-PAGE, and the separated proteins were transferred to membranes. A rabbit polyclonal anti-phospho-Akt/PKB antibody (0.3 µg/ml) was used to identify the active enzyme. Immunoreactive bands were detected using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and enhanced chemiluminescence. Immunoreactive bands were visualized by autoradiography and quantified in a densitometer (model GS-700 imaging densitometer, Bio-Rad, Hercules, CA) using the Molecular Analyst software (Bio-Rad).

Membrane association of PKCδ was used as an index of enzyme activation, and it was performed as described previously (García-Sáinz and Alcántara-Hernández, 1998). In brief, cells were stimulated and the reaction stopped by the addition of lysis buffer and homogenization. Homogenates were centrifuged at 28,000g for 20

min. Supernatants were discarded and protein in the pellets was determined (Lowry et al., 1951). Samples (50 µg) were separated by SDS-PAGE followed by electrophoretic transfer to membranes. Immunoblotting was performed as described above using a PKCδ-selective antibody.

Results

In agreement with previous results (García-Sáinz et al., 1998), Ang II caused a rapid 2- to 3-fold increase of [Ca²⁺]_i in C9 cells (Fig. 1). This reached a maximum at 100 nM and had an EC₅₀ of ~5 nM (data not shown; see García-Sáinz et al., 1998). When the cells were stimulated with Ang II, a transient increase of [Ca²⁺]_i was observed and the cells became less responsive or refractory to a second stimulation by 100 nM Ang II (Fig. 1, A and C). The desensitization to the second stimulation to Ang II was dependent on the concentration of the initial stimulus; the concentration-response curve showed an EC₅₀ value of 2 nM for the desensitization process (Fig. 1B). Desensitization of the response to Ang II was not due to depletion of the relevant phosphoinositide or intracellular calcium pools, as evidenced by the ability of vasopressin, bradykinin, and lysophosphatidic acid to increase [Ca²⁺]_i in cells that exhibited refractoriness to Ang II (Fig. 1C).

Activation of PKC and PKA by treatment with 1 µM TPA or 100 µM dibutyryl cyclic AMP, respectively, also decreased the magnitude of the [Ca²⁺]_i response to Ang II (Fig. 2A). Again, this was not due to depletion of calcium pools as evidenced by the ability of other agents, such as lysophosphatidic acid or thapsigargin, to increase [Ca²⁺]_i (Fig. 2B). In these cases, the desensitization of the Ang II response was both partial (~30%) and very rapid, being evident after only

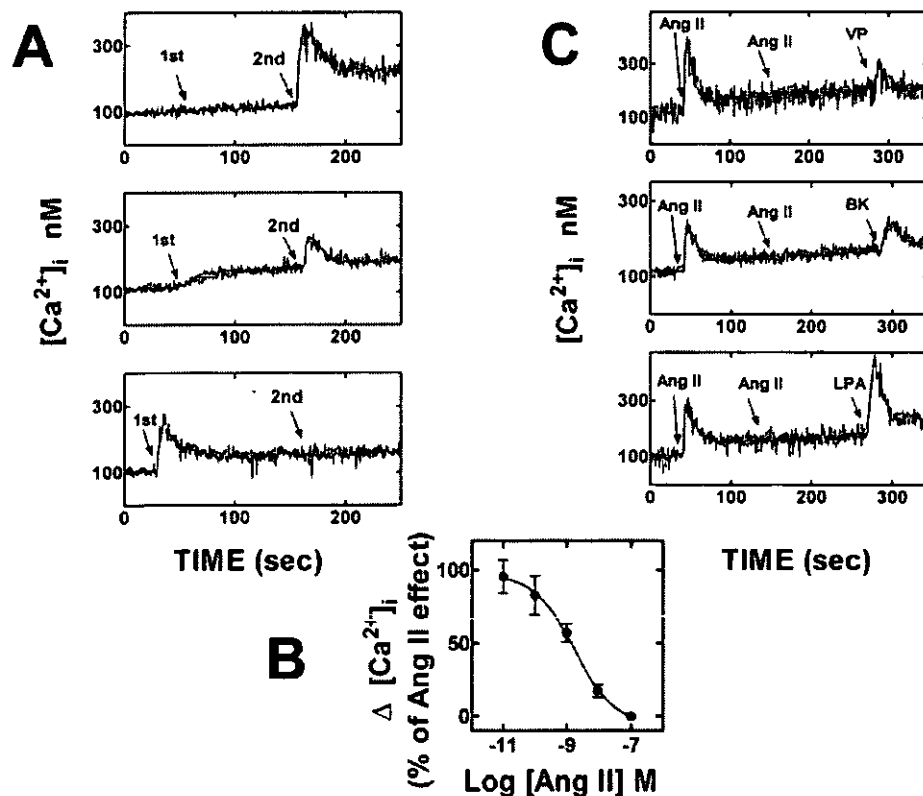


Fig. 1. Homologous desensitization of AT₁-Rs in clone 9 cells. **A**, cells were stimulated (1st) with 10 pM (upper trace), 1 nM (middle trace), or 100 nM Ang II incubated for ~2 min and challenged again with 100 nM Ang II (2nd). Intracellular calcium was measured as described under *Experimental Procedures*. **B**, concentration dependence of Ang II-induced desensitization. The concentration of Ang II used during the first stimulation is indicated in the abscissa, and in the ordinate, the response to 100 nM Ang II (second stimulation, as a percentage of the response of cells not previously stimulated) is plotted. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of seven independent experiments. **C**, cells were stimulated with 100 nM Ang II, challenged again with the same concentration of Ang II, and further challenged with 10 nM vasopressin (VP), 10 nM bradykinin (BK), or 1 µM lysophosphatidic acid (LPA). In all cases traces are representative of five to seven determinations using different cell preparations.

1 min of exposure to the PKA and PKC activators (Fig. 2A). Initial stimulation of the cells with lysophosphatidic acid or vasopressin reduced the subsequent response to Ang II, and this was not due to depletion of calcium pools as evidenced by the ability of thapsigargin to increase [Ca²⁺]_i (Fig. 3). These data indicate that the Ang II-induced phosphoinositide/Ca²⁺ response is subject to both homologous and heterologous desensitization in C9 cells.

To study receptor phosphorylation, photoaffinity labeling and immunoprecipitation studies of the AT₁-R were performed. As shown in Fig. 4A, photoaffinity labeling with

¹²⁵I-[Sar¹,(4-N₃)Phe⁸]Ang II gave a broad band with molecular mass in the 66- to 97-kDa range. Photoaffinity labeling intensity was markedly decreased by Ang II and losartan, a nonpeptide AT₁-R antagonist, but not by PD123177, a nonpeptide AT₂ receptor antagonist (Fig. 4A). The photolabeled band was effectively immunoprecipitated by the selective anti-AT₁-R antibody (Fig. 4B). When membranes were subjected to enzymatic deglycosylation, the labeled 66- to 97-kDa band was no longer evident, and components with lower molecular mass (46–41 kDa) were observed (Fig. 4B); with longer deglycosylation times, the ~41-kDa band was the

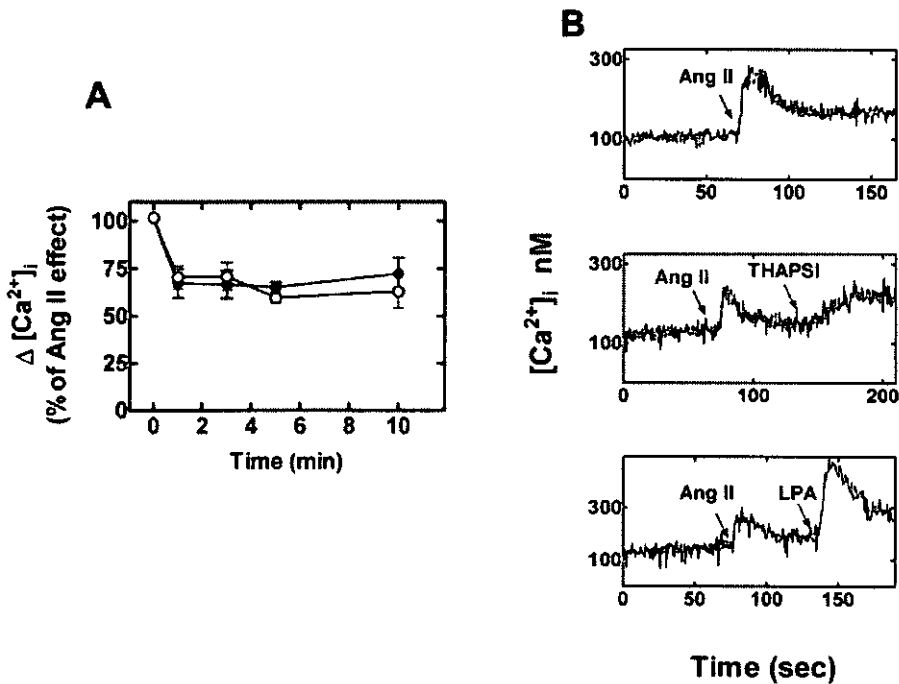


Fig. 2. Effect of TPA and dibutyryl cyclic AMP on Ang II-induced increase in [Ca²⁺]_i. A, cells were incubated for the times indicated in the presence of 100 μM dibutyryl cyclic AMP (○) or 1 μM TPA (●) and challenged with 100 nM Ang II; data are expressed as a percentage of the response of cells not previously stimulated. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of six to eight independent experiments. B, cells were incubated for 5 min in the absence of any agent (upper panel), with 1 μM TPA (middle panel), or with 100 μM dibutyryl cyclic AMP (lower panel) and challenged with 100 nM Ang II. Where indicated, 10 μM thapsigargin (THAPSI) or 1 μM lysophosphatidic acid (LPA) was added. In all cases, traces are representative of five to seven determinations using different cell preparations.

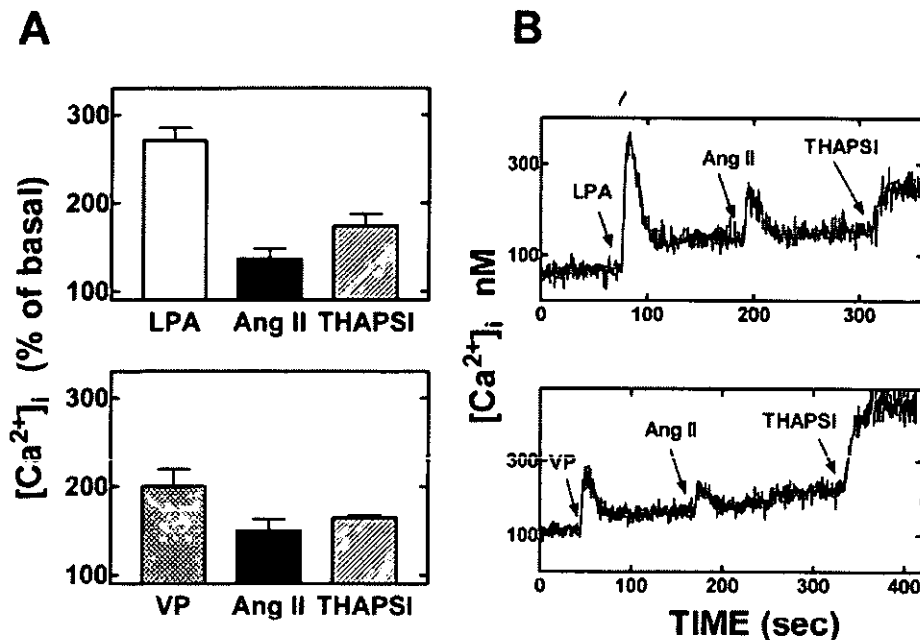


Fig. 3. Effect of lysophosphatidic acid and vasopressin on Ang II-induced increase in [Ca²⁺]_i. A, cells were incubated with 1 μM lysophosphatidic acid (LPA; □) or 10 nM vasopressin (VP; □) for 2 min and then were challenged with 100 nM Ang II; where indicated, 1 μM thapsigargin (THAPSI) was added. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of six to eight experiments using different cell preparations. B, representative tracings.

major band detected (data not shown). It is also evident in Fig. 4B that the antibody was able to immunoprecipitate the enzymatically deglycosylated receptor.

During phosphorylation studies, analysis of the deglycosylated samples revealed labeled bands in the 46- to 41-kDa range (Fig. 5). However, in the absence of glycosidase treatment only a broad labeled band in the 66- to 97-kDa range was observed (data not shown). These data indicate that the ³²P-labeled bands correspond to the AT₁-R detected in the photoaffinity-labeling studies. It should be noted that the basal labeling of the AT₁-R was very small and was almost undetectable in some experiments. Stimulation with Ang II markedly increased AT₁-R phosphorylation in a concentration-dependent manner (Fig. 5A) with an EC₅₀ value of 0.4 nM. TPA also increased receptor phosphorylation in a concentration-dependent fashion (EC₅₀, 2.8 nM) (Fig. 5B). The receptor phosphorylation induced by Ang II was consistently greater than that induced by TPA. When both agents were

used together to stimulate the cells, the effect was almost additive (Fig. 5C).

We next examined the effects of specific inhibitors to define the role of different protein and lipid kinases in these effects. As expected, the action of TPA was completely blocked by 1 μM bisindolylmaleimide I (Fig. 6). However, Ang II-induced AT₁-R phosphorylation was reduced to a more limited extent (~30%). Wortmannin and LY294002, inhibitors of PI3K activity, also reduced Ang II-induced AT₁-R phosphorylation (Fig. 7A). The effects of these inhibitors were concentration-dependent, with IC₅₀ values for wortmannin and LY294002 of 8 nM and 125 nM, respectively (Fig. 7B). The inhibitory actions of wortmannin and bisindolylmaleimide I were not additive (data not shown). None of the inhibitors altered the low basal phosphorylation of the AT₁ receptor. Inhibitors of PKC and PI3K were unable to block the homologous desensitization of the calcium response to Ang II.

Pretreatment of the cells with pertussis toxin consistently

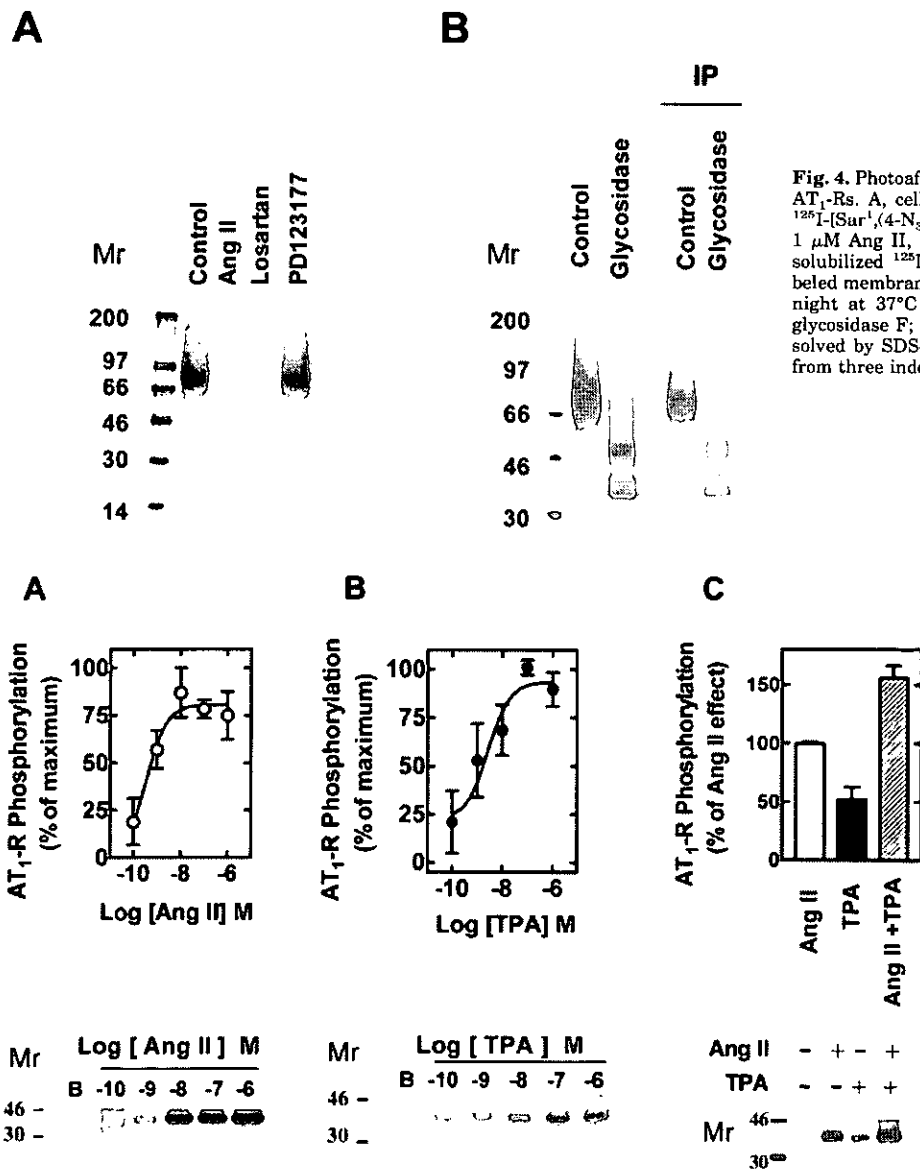


Fig. 5. Ang II- and TPA-induced AT₁-R phosphorylation. A and B, the indicated concentrations of Ang II (○) and TPA (●) were used. The maximum phosphorylation induced by each agent was considered as 100% and basal phosphorylation as 0%. C, cells were incubated with 100 nM Ang II (open column), 1 μM TPA (solid column), or both agents (hatched column) for 5 min. Representative images are presented below each graph. Data are expressed as the receptor phosphorylation induced by 100 nM Ang II. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of three to four determinations using different cell preparations.

Fig. 4. Photoaffinity labeling and immunoprecipitation of AT₁-Rs. A, cells were incubated overnight at 4°C with ¹²⁵I-[Sar¹,(4-N₃)Phe⁸]Ang II in the presence or absence of 1 μM Ang II, 10 μM losartan, or 10 μM PD123177. B, solubilized ¹²⁵I-[Sar¹,(4-N₃)Phe⁸]Ang II photoaffinity-labeled membranes from clone 9 cells were incubated overnight at 37°C in the absence or presence of 10 U/ml glycosidase F; AT₁-Rs were immunoprecipitated and resolved by SDS-PAGE. A representative image is shown from three independent experiments.

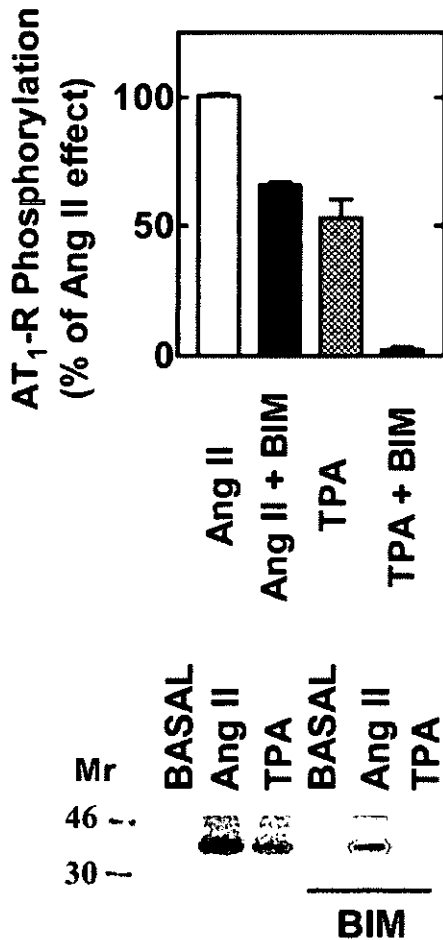


Fig. 6. Effect of bisindolylmaleimide I on AT₁-R phosphorylation. Cells were preincubated for 30 min without or with 1 μM bisindolylmaleimide I (BIM, ■) and then stimulated with 100 nM Ang II (□) or 1 μM TPA (▨). Data are expressed as the receptor phosphorylation induced by 100 nM Ang II. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of three to four experiments using different cell preparations. A representative image is shown.

reduced Ang II-induced AT₁-R phosphorylation (Fig. 8), suggesting that G_i protein(s) participate in the mechanism of receptor phosphorylation. The possibility that such G proteins could mediate the effects of PI3K and PKC was tested. However, the abilities of wortmannin and bisindolylmaleimide I to decrease Ang II-induced AT₁-R phosphorylation were not affected in pertussis toxin-treated cells (data not shown).

The extent to which heterologous stimulation by lysophosphatidic acid and vasopressin or activation of PKA could induce AT₁-R phosphorylation was also examined. As shown in Fig. 9, upper panels, vasopressin, lysophosphatidic acid, and dibutyryl cyclic AMP significantly increased AT₁-R phosphorylation. To study the roles of PKC and PI3K in the AT₁-R phosphorylations induced by lysophosphatidic acid and vasopressin, the effects of wortmannin and bisindolylmaleimide I were examined. As shown in Fig. 9, lower panels, wortmannin did not alter the receptor phosphorylations induced by these agents, but the PKC inhibitor, bisindolylmaleimide I, markedly reduced such receptor phosphorylation. However, treatment with bisindolylmaleimide I did not affect the desensitization of the Ang II-mediated calcium response induced by lysophosphatidic acid or vasopressin (data not shown).

To obtain more evidence about the ability of Ang II to activate PKC and PI3K, Akt/PKB phosphorylation and membrane association of PKCδ were studied. Akt/PKB is a serine/threonine kinase substrate of PDK-1 whose activation has been shown to be mediated through PI3K activity (Alessi and Cohen, 1998; Chow et al., 1998; Stephens et al., 1998). As shown in Fig. 10A, Ang II (100 nM) increased Akt/PKB phosphorylation with a maximum at 5 min. The effect of Ang II was concentration-dependent (EC₅₀, 2 nM) (Fig. 10B) and was blocked by the AT₁ antagonist, losartan, and by the PI3K inhibitors, wortmannin (100 nM) and LY294002 (1 μM) (Fig. 10C). EGF (100 ng/ml) was used as a positive control. Activation of Akt/PKB by Ang II has previously been observed in smooth muscle cells (Takahashi et al., 1999). Figure 10D shows that Ang II increased membrane-associated PKCδ and that this effect was reduced by 1 μM bisindolylmaleimide I.

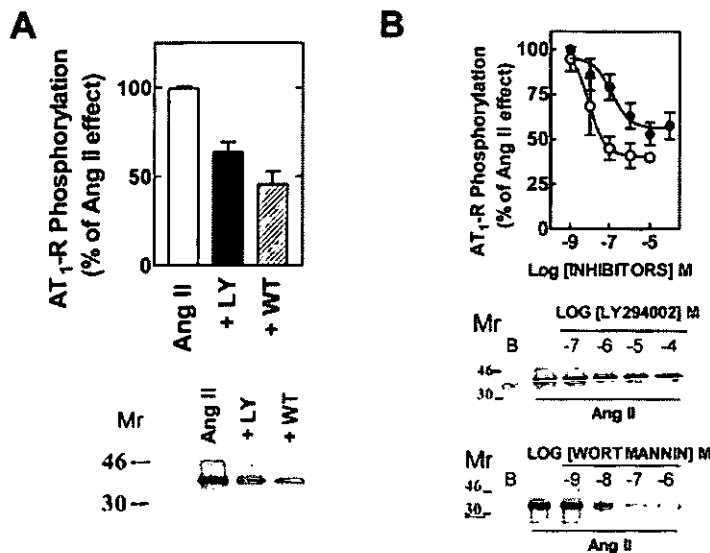


Fig. 7. Role of PI3K on Ang II-induced AT₁-R phosphorylation. A, cells were preincubated for 30 min with maximal 15 μM LY294002 (+LY) or 100 nM wortmannin (+WT) and then stimulated for 5 min with 100 nM Ang II. B, cells were preincubated with the indicated concentration of LY294002 (●) or wortmannin (○) for 30 min and then stimulated for 5 min with 100 nM Ang II. Data are expressed as a percentage of the receptor phosphorylation induced by 100 nM Ang II. Representative images are shown. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of three to four determinations using different cell preparations.

Discussion

This study has shown that the endogenous AT₁-Rs expressed in C9 cells are subject to homologous and heterologous desensitization and that such desensitization is associated with receptor phosphorylation. Although C9 cells have a limited AT₁-R density (Kozłowski et al., 1993), these receptors were clearly identified by photoaffinity labeling and exhibited the anticipated pharmacological profile in competition studies. In bovine adrenal glomerulosa cells, Smith et al. (1998b) observed that phosphorylated AT₁-Rs run as a broad 60- to 65-kDa band in SDS-PAGE. This is shifted to a molecular mass of ~41 kDa after deglycosylation, consistent with the predicted size of the cloned AT₁ receptor protein (41

kDa). In the present study, phosphorylated AT₁-Rs ran in SDS-PAGE as a broader band of higher molecular mass (66–97 kDa); nevertheless, the deglycosylated receptors also shifted to a molecular mass of ~41 kDa. These data suggest that the AT₁ receptors in C9 cells may be more extensively glycosylated than those expressed in adrenal glomerulosa cells. The broad migration pattern of the endogenous AT₁-Rs in the C9 cell line, together with the possible presence of comigrating nonreceptor phosphoproteins, could interfere with the quantification of glycosylated phospho-AT₁-Rs. For this reason, the solubilized ³²P-labeled phospho-AT₁-Rs were subjected to enzymatic deglycosylation before SDS-PAGE analysis.

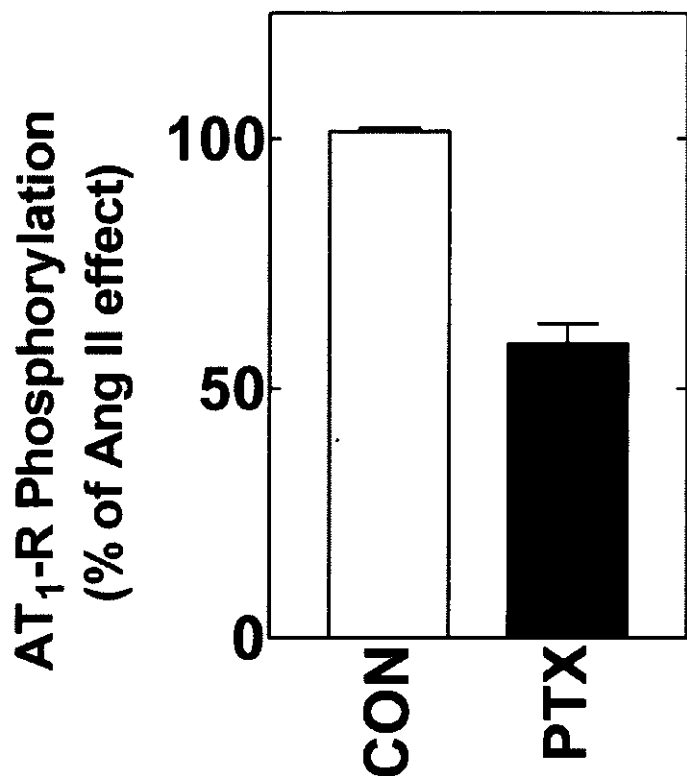
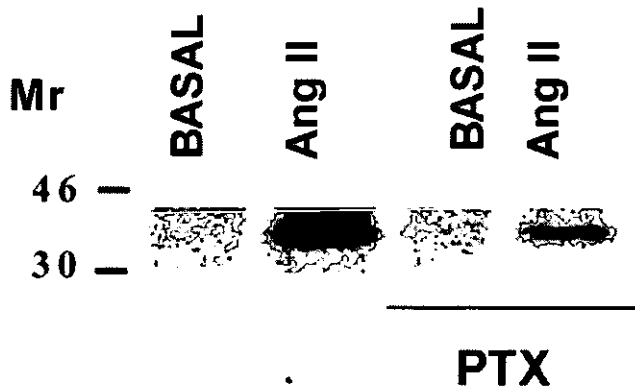


Fig. 8. Effect of pertussis toxin on Ang II-induced AT₁-R phosphorylation. Cells were preincubated or not with 100 ng/ml of pertussis toxin (PTX) overnight and then stimulated for 5 min with 100 nM angiotensin II (Ang II). Data are expressed as the receptor phosphorylation induced by 100 nM Ang II in control cells. A representative image is shown. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of three determinations using different cell preparations.



In this study, we observed that activation of PKC with TPA stimulated receptor phosphorylation and decreased the responsiveness of the cells to Ang II. The effects of TPA on AT₁-R phosphorylation, and on the functional response, were of smaller magnitude than those induced by Ang II, the natural agonist. The carboxyl termini of AT₁-Rs contain several phosphorylation sites and motifs involved in receptor internalization (Hunyady et al., 1994; Thomas et al., 1995; Oppermann et al., 1996; Balmforth et al., 1997; Qian et al., 1999). Certain sites, including Ser³³¹, Ser³³⁸, and Ser³⁴⁸, have been identified as putative PKC phosphorylation sites (Smith et al., 1998b; Qian et al., 1999).

Our studies in Ang II-stimulated C9 cells showed that the natural agonist markedly desensitized the [Ca²⁺]_i response

and induced a receptor-selective refractory period. In addition, Ang II induced prominent AT₁-R phosphorylation. Treatment with both Ang II and TPA caused an almost additive degree of receptor phosphorylation. These data initially suggested the possibility that these phosphorylations could represent two separate processes. However, the effects of bisindolylmaleimide I indicated that this was not the case and that Ang II-induced AT₁-R phosphorylation is in part attributable to PKC. It is possible that activation of AT₁-Rs partially stimulates certain PKC isoforms present in C9 cells, whereas TPA induces a full and sustained activation of all phorbol ester-sensitive isoforms expressed in the cells. These findings may reflect differences in the intensity, kinetics, and nature of the PKC isoforms affected by the actions of the

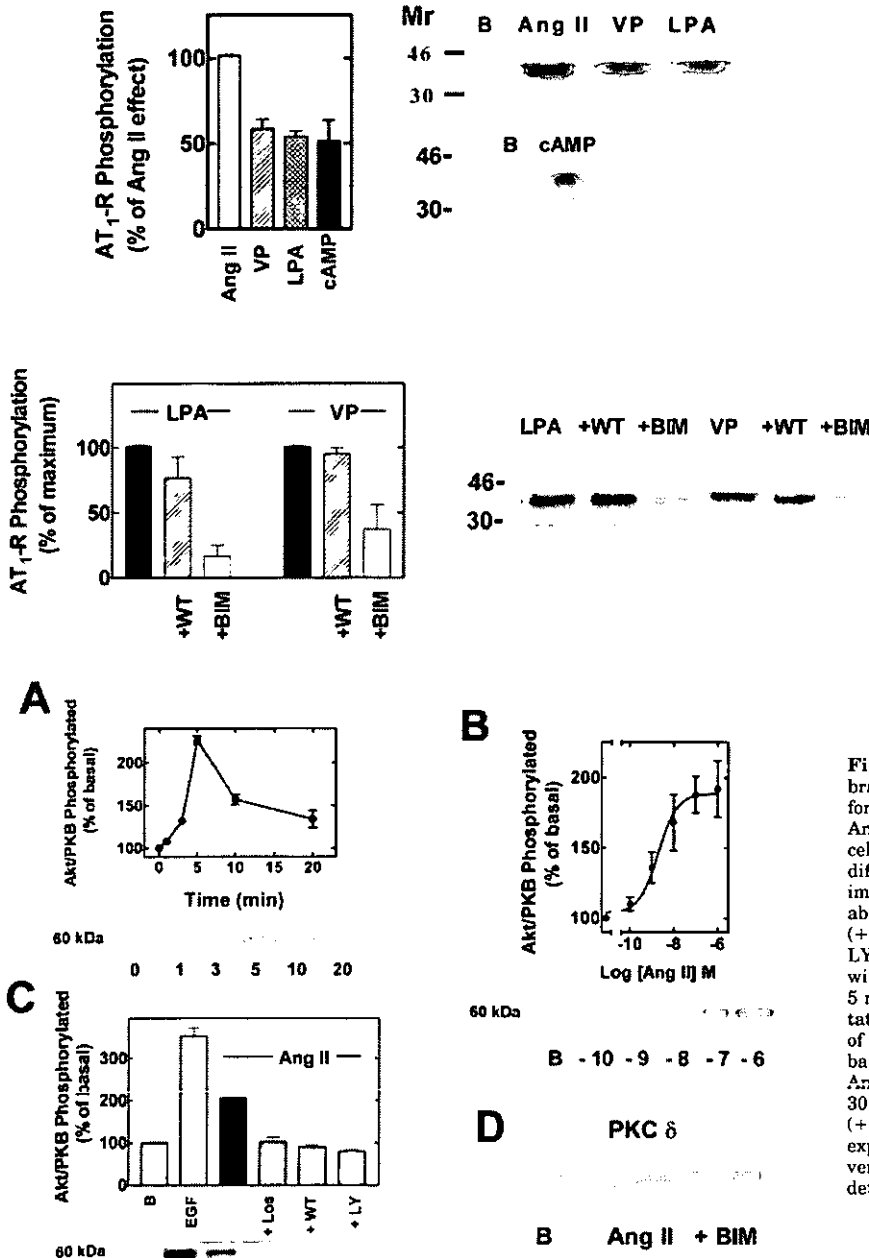


Fig. 9. Phosphorylation of AT₁-Rs induced by dibutyryl cyclic AMP, vasopressin, and lysophosphatidic acid. Upper panels, cells were stimulated with 100 nM Ang II, 10 nM vasopressin (VP), 1 μM lysophosphatidic acid (LPA), or 100 μM dibutyryl cyclic AMP (cAMP) for 5 min. Representative images are shown. Data are expressed as the percentage of phosphorylation induced by 100 nM Ang II. Lower panels, cells were incubated in the absence of any agent, 100 nM wortmannin (+WT), or 1 μM bisindolylmaleimide I (BIM) for 30 min and then were stimulated with 1 μM lysophosphatidic acid (LPA) or 10 nM vasopressin (VP) for 5 min. A representative image is shown. Data are expressed as the percentage of phosphorylation induced by lysophosphatidic acid or vasopressin alone. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of three to four determinations using different cell preparations.

Fig. 10. Phosphorylation of Akt/PKB and membrane association of PKCδ. A, cells were incubated for the times indicated in the presence of 100 nM Ang II. A representative image is presented. B, cells were incubated for 5 min in the presence of different concentrations of Ang II. A representative image is presented. C, cells were incubated in the absence of any agent or presence of 10 μM losartan (+Los), 100 nM wortmannin (+WT), or 1 μM LY294002 (+LY) for 30 min and then challenged with 100 nM Ang II for 5 min; EGF (100 ng/ml for 5 min) was used as a positive control. A representative image is presented. D, representative image of PKCδ-membrane association; cells were incubated in the absence of any agent (B), with 100 nM Ang II for 5 min, or with bisindolylmaleimide I for 30 min followed by 100 nM Ang II for 5 min (+BIM). An image representative of three different experiments is shown. The means are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. of three to four determinations using different cell preparations.

agonist and TPA. In transfected human embryonic kidney 293 cells, agonist-induced AT₁-R phosphorylation was partially blocked by the PKC inhibitor, staurosporine, and was completely suppressed by the concomitant expression of a dominant GRK2 mutant (Oppermann et al., 1996). Also, it has been observed that bisindolylmaleimide I partially blocked Ang II-induced AT₁-R phosphorylation (Qian et al., 1999). In addition, alanine replacement of putative PKC consensus sites (Ser³³¹, Ser³³⁸, and Ser³⁴⁸) markedly decreased (70%) TPA-induced AT₁-R phosphorylation and also reduced (60%) the receptor phosphorylation induced by Ang II (Qian et al., 1999). Our data also indicate that Ang II-induced AT₁-R phosphorylation and desensitization are partially dependent on PKC activity in clone 9 cells. It is likely that GRKs play a major role in agonist-induced receptor phosphorylation (Oppermann et al., 1996) and that this may depend on the agonist concentration and the cell type studied.

An interesting finding of the present study was the apparent role of PI3K in AT₁ receptor phosphorylation. We have previously observed that lysophosphatidic acid induces α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation. This effect is mediated through LPA receptors coupled to pertussis toxin-sensitive G proteins via PI3K and PKC (Casas-González et al., 2000). To the best of our knowledge, this was the first evidence for a role of PI3K in the phosphorylation of a GPCR. In the present study, the use of selective inhibitors suggests that PI3K is also involved in Ang II-induced AT₁-R phosphorylation. The IC₅₀ values obtained for wortmannin and LY294002 (8 and 125 nM, respectively) are comparable with those that inhibit lysophosphatidic acid-induced α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation (4 and 60 nM, respectively). Interestingly, the effects of PI3K inhibitors and bisindolylmaleimide I are not additive, which suggests that these families of kinases act sequentially in the same pathway. Phosphorylation of Akt/PKB in response to Ang II and its sensitivity to PI3K inhibitors further suggest a role of the phospholipid kinase in this process.

The PI3K family of enzymes has been grouped into several classes. Class IA PI3K isoforms interact with phosphorylated tyrosine motifs of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, whereas PI3K γ (a class IB isoform) interacts with heterotrimeric G proteins; such interactions seem to control PI3K activity (Wymann and Pirola, 1998).

PI3K can stimulate PKC through the phosphoinositides generated by its activity. Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate and phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate have been reported to activate both novel (δ , ϵ , and η) and atypical (ζ and λ) PKC isoforms (Nakanishi et al., 1993; Wymann and Pirola, 1998; Rameh and Cantley, 1999). An intermediary kinase, such as the recently identified phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) (Stephens et al., 1998; Alessi and Cohen, 1998) may also participate in the control of PKC. PDK1, which binds with high affinity to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, phosphorylates the activation loop sites of PKC ζ and PKC δ in vitro and in a PI3K-dependent manner in vivo (Chow et al., 1998; Le Good et al., 1998). Interestingly, the classical PKC α , β I, and β II isoforms bind directly to PDK1 coexpressed in human embryonic kidney 293 cells (Le Good et al., 1998), raising the possibility of general control of the PKC family by PDK1.

The partial inhibition of Ang II-induced AT₁-R phosphorylation by pertussis toxin was unexpected, since we previ-

ously observed in C9 cells that several Ang II-stimulated responses, including phosphoinositide turnover, calcium mobilization, and proto-oncogene expression, were mediated by pertussis toxin-insensitive G proteins (García-Sáinz et al., 1998). Nevertheless, it is well established that AT₁-R activation in liver cells inhibits adenylyl cyclase and stimulates the synthesis and secretion of angiotensinogen through pertussis toxin-insensitive G_i proteins (Klett et al., 1990; Bauer et al., 1991).

The present findings, and current concepts of receptor phosphorylation/desensitization, suggest the following sequence of events in Ang II-induced AT₁-R phosphorylation in the C9 liver cell line: 1) Ang II activation of AT₁-Rs stimulates both pertussis toxin-insensitive G proteins, probably of the G_{q/11/14} family, and pertussis toxin-sensitive G proteins, probably of the G_i family; 2) activated G proteins catalyze the GDP-GTP exchange reaction that results in the dissociation of G α subunits and G $\beta\gamma$ complexes; 3) the released $\beta\gamma$ complexes recruit soluble GRKs that phosphorylate AT₁-Rs, promoting the binding of β -arrestin and stabilizing an uncoupled state (Krupnick and Benovic, 1998); and 4) the released $\beta\gamma$ complexes also activate PI3K, which leads to activation of PKC and additional AT₁-R phosphorylation that further contributes to receptor desensitization.

This work also provides evidence that AT₁-R phosphorylation can be induced by activation of other GPCRs, agents that act on different receptors, such as vasopressin and lysophosphatidic acid, and through activation of PKA. PKC was involved in the AT₁-R phosphorylations induced by lysophosphatidic acid and vasopressin, although other pathways also seem to participate. Such cross-talk between receptors could be physiologically important in the many cell types in which AT₁-R are coexpressed with a variety of others GPCRs.

References

- Abdellatif MM, Newbauer CF, Lederer WJ and Rogers TB (1991) Angiotensin induced desensitization of the phosphoinositide pathway in cardiac cells occurs at the level of the receptor. *Circ Res* 69:800–809.
- Alessi DR and Cohen P (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 8:55–62.
- Balmforth AJ, Shepherd FH, Warburton P and Ball SG (1997) Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT_{1A} receptor. *Br J Pharmacol* 122:1469–1477.
- Bauer PH, Chiu AT and Garrison JC (1991) DuP 753 can antagonize the effects of angiotensin II in rat liver. *Mol Pharmacol* 39:579–585.
- Boulay G, Chretien L, Richard DE and Guillemette G (1994) Short-term desensitization of the angiotensin II receptor of bovine adrenal glomerulosa cells corresponds to a shift from a high to a low affinity state. *Endocrinology* 135:2130–2136.
- Bouscariet B, Augert G, Taylor SJ and Exton JH (1990) Alterations in vasopressin and angiotensin II receptors and responses during cell culture of rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1055:265–272.
- Casas-González P, Vázquez-Prado J and García-Sáinz JA (2000) Lysophosphatidic acid modulates α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation and function: Roles of G_i and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol* 67:1027–1033.
- Chow MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS and Tokar A (1998) Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 8:1069–1077.
- García-Sáinz JA and 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 JA, García-Caballero A and González-Espinoza C (1998) Angiotensin AT₁ receptors in Clone 9 rat liver cells: Calcium signaling and c-fos expression. *Eur J Pharmacol* 322:235–243.
- García-Sáinz JA and Macías-Silva M (1990) Angiotensin II stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylase through AII-1 receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 172:780–785.
- García-Sáinz JA, Romero-Avila MT, Ruiz-Arriaga A, Ruiz-Puente J, Agundis C, Ortiz V and Isibasi A (1992) Characterization and detoxification of an easily prepared acellular pertussis vaccine. Antigenic role of the A protomer of pertussis toxin. *Vaccine* 10:341–344.
- Gryniewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450.
- Hunyady L, Bor M, Balla T and Catt KJ (1994) Identification of a cytoplasmic

- Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT₁ angiotensin receptor. *J Biol Chem* **269**:31378–31382.
- Inagami T, Mizukoshi M and Guo DF (1994) Angiotensin II receptor: Molecular cloning, functions and regulation, in *Angiotensin Receptors* (Saavedra JM and Timmermans PBMWM eds) pp 1–15, Plenum Press, New York.
- Jackson EK and Garrison JC (1996) Renin and Angiotensin, in *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddpm RW, and Gilman AG eds) pp 733–758, McGraw-Hill, New York.
- Klett C, Muller F, Gierschik P and Hackenthal E (1990) Angiotensin II stimulates angiotensinogen synthesis in hepatocytes by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *FEBS Lett* **259**:301–304.
- Kozlowski MR, Arcuri M and Zynardi L (1993) Comparison of the binding and functional actions of angiotensin agonists in clone 9 cells: Evidence for angiotensin II receptor heterogeneity. *J Receptor Res* **13**:1031–1040.
- Krupnick JG and Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**:289–319.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural head proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* **227**:680–686.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P and Parker PJ (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK. *Science (Wash DC)* **281**:2042–2045.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS and Bernstein KE (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature (London)* **351**:233–236.
- Nakanishi H, Brewer KA and Exton JH (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **268**:13–16.
- Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW and Lefkowitz RJ (1996) Phosphorylation of the type IA angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem* **271**:13266–13272.
- Qian H, Pipolo L and Thomas WG (1999) Identification of protein kinase C phosphorylation sites in the angiotensin II (AT_{1A}) receptor. *Biochem J* **343**:637–644.
- Rameh LE and Cantley LC (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**:8347–8350.
- Sasaki K, Yamano Y, Bardham S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y and Inagami T (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature (London)* **351**:230–232.
- Sekura RD, Fish F, Manclark CR, Meade B and Zhang Y (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **258**:14646–14651.
- Smith RD, Baukal AJ, Zolyomi A, Gaborik Z, Hunyady L, Sun L, Zhang M, Chen H-C and Catt KJ (1998a) Agonist-induced phosphorylation of the endogenous AT₁ angiotensin receptor in bovine adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* **12**:634–644.
- Smith RD, Hunyady L, Olivares-Reyes JA, Mihalik B, Jayadev S and Catt KJ (1998b) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT_{1A} receptor in localized to a serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol Pharmacol* **54**:935–941.
- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J and Hawkins PT (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science (Wash DC)* **279**:710–714.
- Takahashi T, Taniguchi T, Konishi H, Kikkawa U, Ishikawa Y and Yokoyama M (1999) Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **276**:H1927–H1934.
- Tang H, Guo DF, Porter JP, Wanaka Y and Inagami T (1998) Role of cytoplasmic tail of the type IA angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res* **82**:523–531.
- Tang H, Shirai H and Inagami T (1995) Inhibition of protein kinase C prevents rapid desensitization of type 1B angiotensin II receptor. *Circ Res* **77**:239–248.
- Thomas WG (1998) Regulation of angiotensin II type 1 (AT₁) receptor function. *Regul Pept* **79**:9–23.
- Thomas WG, Thekkumkara TJ, Motel TJ and Baker KM (1995) Stable expression of a truncated AT_{1A} receptor in CHO-K1 cells. The carboxyl-terminal region directs agonist-induced internalization but not receptor signaling or desensitization. *J Biol Chem* **270**:207–213.
- Wymann MP and Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim Biophys Acta* **1436**:127–150.

Send reprint requests to: J. Adolfo García-Sáinz, Inst. Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. postal 70-248, México D. F. 04510. E-mail: agarcia@fisiol.unam.mx

DISCUSION

Sitios consenso de fosforilación

La proteína cinasa C fosforila residuos de serina y treonina en secuencias esencialmente básicas, secuencia consenso; X – R – K₁₋₃ – X₀₋₂ – S / T – X₀₋₂ – R – K₁₋₃; la proteína cinasa A, que también fosforila residuos de serina y treonina localizados en regiones básicas, reconoce la siguiente secuencia consenso; R – R – X – S / T – X₀₋₂ – R – K – H – R – K – H – COOH (Kennelly *et al.*, 1991). Se han propuesto a los residuos: Ser³³¹, Ser³³⁸ y Ser³⁴⁸ como los sitios consenso de fosforilación del receptor AT₁ por la PKC y de hecho, como ya se mencionó en la introducción, se ha observado que la fosforilación del receptor inducida por la angiotensina II o por los ésteres de forbol disminuye cuando estos sitios son substituídos por residuos no polares (Qian *et al.*, 1999).

En este trabajo se observó la fosforilación del receptor AT₁ en las células C9 y sugerimos, con base en evidencia experimental previa (Smith *et al.*, 1998b; Qian *et al.*, 1999), que los mismos sitios (Ser³³¹, Ser³³⁸ y Ser³⁴⁸) son fosforilados como consecuencia de la activación de la PKC por el TPA 1 µM y la angiotensina II. Además, es muy probable que otros sitios alternativos localizados en una región básica (K³²³ - A³²⁴ - K³²⁵ - S³²⁶ - H³²⁷ - S³²⁸ - S³²⁹ - L³³⁰ - S³³¹ - T³³² - K³³³) puedan ser fosforilados por la estimulación de la PKA con el dbAMPc 10 µM e incluso por la misma PKC.

Recientemente se ha podido identificar la secuencia consenso mínima que requiere la cinasa Akt / PKB (R – X – R – X – X – S / T) para fosforilar una serie de substratos (Obata *et al.*, 2000). Nosotros observamos que la PKB puede ser activada por la angiotensina II de una manera dependiente de la concentración y además pudimos detectar una activación máxima de esta enzima a los 5 minutos, lo que co-relaciona con la fosforilación del receptor AT₁ mediada por la cinasa PI-3K y la cinasa PKC. Por lo tanto, la cinasa Akt / PKB también podría participar en la fosforilación del receptor AT₁ indirectamente a través de la fosforilación y activación de alguna otra cinasa.

PI-3K y PKC

En este trabajo se tiene evidencia experimental, por primera vez reportada, de la participación de la PI-3K en la fosforilación del receptor AT₁ inducida por su propio agonista. Mediante el uso de inhibidores específicos de la cinasa PI-3K (wortmanina y LY294002) y de la cinasa PKC (bisindolilmaleimida I) se demostró la participación de ambas cinasas en la fosforilación homóloga del receptor. Además se observó que el efecto de los inhibidores para ambas cinasas no es aditivo, lo cual sugiere que la participación de ambas familias de cinasas es secuencial, es decir que la PI-3K y la PKC actúan en la misma ruta o cascada transduccional.

Como ya se mencionó anteriormente, la activación de la PI-3K aumenta los niveles de los fosfatidilinositoles; el fosfatidilinositol 3, 4 bisfosfato (PIP₂) y el fosfatidilinositol 3, 4, 5 trisfosfato (PIP₃), los cuales activan a la cinasa PDK1 y ésta a su vez activa a la Akt / PKB y a la PKC. Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de fosforilación del receptor AT₁ con los inhibidores de la PI-3K, decidimos medir la PKB activada por la angiotensina II con la ayuda de un anticuerpo anti-fosfo Akt / PKB policlonal de conejo en extractos celulares totales. Se observó que la activación de la PKB por la hormona resultó ser completamente bloqueada por la wortmanina y el LY294002. Es claro que la PKC fosforila al receptor AT₁ en respuesta a su ligando endógeno en las células C9 y también que la PKB se activa por el mismo estímulo como resultado de la activación de la PI-3K; sin embargo, se requerirá de estudios con mayor profundidad para esclarecer el papel que tiene la activación de la Akt / PKB en la fosforilación y desensibilización del receptor de angiotensina AT₁.

Se ha demostrado que los fosfatidilinositoles generados por la PI-3K también pueden activar a algunas isoformas de PKC nuevas (δ , ϵ y η) y atípicas (ζ y λ) (Nakanishi *et al.*, 1993; Wymann y Pirola 1998; Rameh y Cantley 1999). Al parecer el PIP₂ y el PIP₃ tienen más de una molécula blanco, ya que la cinasa-1 dependiente de los fosfatidilinositoles (del inglés phosphoinositide dependent protein kinase-1, PDK1) une con alta afinidad a los fosfatidilinositoles. Esta cinasa,

PDK1, además de fosforilar y activar a la PKB (Stephens *et al.*, 1998), es capaz de fosforilar los sitios de activación de la PKC ζ , y PKC δ *in vitro* y de unirse a la PKC α , β I y β II en las células HEK-293 (Chou *et al.*, 1998; LeGood *et al.*, 1998). Es probable, que la activación en secuencia de la PI-3K y PKC en las células C9 para fosforilar al receptor AT₁ esté mediada por la cinasa PDK1.

Se acepta que la regulación de muchas cinasas, incluyendo a la PKC como se mencionó anteriormente en la parte introductoria de este trabajo, está dada por tres aspectos básicos, 1) La localización subcelular de la enzima, 2) Las alteraciones en la actividad intrínseca de cinasa y 3) Las alteraciones en los niveles de expresión.

A nosotros nos interesó estudiar las isoformas de PKCs que se podían translocar a la membrana celular en respuesta a la estimulación de las células C9 con 100 nM de angiotensina II y observamos que la isoforma PKC δ se asocia a la membrana en condiciones no estimulantes. Sin embargo, la asociación de la PKC δ a la membrana se incrementa en presencia de la angiotensina II y se inhibe parcialmente por la bisindolilmaleimida I. También pudimos observar un efecto de translocación de la isoforma α a la membrana inducida por el TPA, pero no por la angiotensina II (resultados no publicados, Fig. 1). Cabe mencionar que también la isoforma δ se transloca a la membrana en respuesta al TPA a los 5 minutos de estimulación. La translocación diferencial a la membrana de distintas isoformas de PKC inducida por el TPA y la angiotensina II, sugiere que estos dos agentes tienen una acción diferencial en la cinética de activación de las isoformas de PKC, lo cual explicaría los efectos observados en la fosforilación del receptor AT₁ por la hormona y el TPA. Es decir, es posible que la angiotensina II esté activando parcialmente algunas isoformas de PKC, como la isoforma δ y que el TPA indujera una activación sostenida de todas las isoformas sensibles a ésteres de forbol que se expresen en las células C9.

Es necesario enfatizar la participación que tiene la PKC en los procesos de fosforilación y desensibilización del receptor de angiotensina, AT₁, ya que en este trabajo se observó que la PKC no solamente participa en la fosforilación homóloga del receptor, sino también en la heteróloga mediante la activación de los

receptores al ácido lisofosfatídico y a la vasopresina. Más aún, en este trabajo se confirma la participación de esta cinasa en el proceso de desensibilización heteróloga del receptor, ya que había reportes en donde los resultados experimentales excluían la activación de la PKC en el proceso de desensibilización del receptor AT₁ (Thomas *et al.*, 1996).

La activación de la PKC promueve la fosforilación de diversas proteínas que están involucradas en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, así como la apoptosis. La isoforma PKC δ se expresa en diversos tipos celulares y se le ha asociado con la proliferación y diferenciación celular. Por ejemplo, la PKC δ inhibe la proliferación de las células del músculo liso (Fukumoto *et al.*, 1997), de células gliales (Brodie *et al.*, 1998) y de células C6 de glioma al ser fosforilada en tirosina en respuesta a la estimulación del receptor a PDGF (Kronfeld *et al.*, 2000). También se ha observado que esta isoforma se activa y se transloca durante la diferenciación de los queratinocitos (Denning *et al.*, 1995) y cuando se sobreexpresa en las células mieloides induce su diferenciación (Mischak *et al.*, 1993).

La translocación de la PKC δ a la membrana inducida por la angiotensina II, así como el efecto observado del inhibidor específico (bisindolilmaleimida I) en la fosforilación del receptor AT₁ en las células C9, sugieren fuertemente que parte de la fosforilación del receptor inducida por la angiotensina II es mediada por esta isoforma de PKC. En función de complementar estos resultados, sería interesante estudiar si esta isoforma en particular tiene algún efecto en la proliferación celular inducida por la angiotensina II.

Actualmente existen en circulación diferentes inhibidores de las isoformas de PKCs, de los cuales las bisindolilmaleimidias, como el BIM I, el Go6983, el Go6850, el Ro317208, entre muchos más, son algunos de los compuestos más selectivos para este grupo de cinasas. Sin embargo, la mayoría de los compuestos farmacológicos que existen hoy en día inhiben a más de dos o tres isoformas de PKCs, dependiendo de la afinidad que tienen por cada isoforma. Es por ello que el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos aún más selectivos ayudará a entender las funciones celulares de cada isoforma de esta familia de enzimas y también proveerán de una buena herramienta terapéutica, dado que se

ha atribuido una participación de las PKCs en diversas enfermedades, como las cardíacas y el cáncer (Wakasaki *et al.*, 1997; Geiger *et al.*, 1998).

PKA

Al realizar la presente tesis, se obtuvo evidencia experimental suficiente que demuestra la participación de la PKA en la fosforilación y desensibilización heterólogas del receptor AT₁ en las células C9 (Fig. 2, pag. 579 del artículo y Fig. 9, pag. 583 del artículo). Estos resultados sugieren, al igual que los resultados de otros estudios de algunos investigadores (Houslay 1991; Oppermann *et al.*, 1996), que el evento de fosforilación del receptor AT₁ inducido por la PKA pudiera ser, en parte, el responsable de la desensibilización heteróloga del receptor.

Cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs)

Las GRKs son proteínas de aproximadamente 57-80 kDa, miembros de una familia grande de cinasas de serina y treonina. Hasta la fecha ya se han clonado seis GRKs en mamíferos (Palczewski 1997; Krupnick y Benovic 1998; Pitcher *et al.*, 1998). Se ha observado que la GRK1 (cinasa de la rodopsina) y la GRK4 se expresan de una manera tejido-específica (en la retina y en el testículo, respectivamente) y por lo tanto se cree que regulan un número limitado de substratos (Palczewski 1997). En contraste, las demás GRKs están distribuidas más ampliamente y hay evidencia experimental de que participan en la desensibilización y fosforilación de varios receptores acoplados a proteínas G (Palczewski 1997).

Con base en nuestros experimentos, en donde observamos una fosforilación residual del receptor AT₁ siempre que preincubamos las células con uno o más de los inhibidores de cinasas (bisindolilmaleimida I, wortmanina o LY294002) e incluso con la toxina de pertussis, concluimos que otras cinasas distintas de la PKC y PI-3K, como las GRKs, están involucradas en la fosforilación homóloga del receptor. La participación de las GRKs en la fosforilación del

receptor AT₁ en la línea celular C9 se sustenta en lo siguiente: 1) Se ha observado que las GRK2, GRK3 y GRK5 fosforilan a los receptores de angiotensina AT₁ (Ishizaka *et al.*, 1997; Oppermann *et al.*, 1996), a los receptores β₂-adrenérgicos (Premont *et al.*, 1995; Menard *et al.*, 1996) y a los receptores muscarínicos M2 y M3 (Richardson *et al.*, 1993; Debburman *et al.*, 1995). 2) Por ensayos de "Western-Blot" realizados en el laboratorio se demuestra la expresión endógena de la GRK5 en las células C9 (resultados no publicados, Fig. 2). 3) También en experimentos previos realizados en el laboratorio se observó que el receptor AT₁ se acopla al sistema transduccional de recambio de fosfoinosítidos-calcio (García-Sáinz y García-Caballero 1998) a través de la activación de la proteína G_q y algunos resultados del presente trabajo sugieren que el receptor también se acopla a la proteína G_i. Ambas proteínas G heterotriméricas cuando son activadas por el receptor liberan los dímeros βγ, los cuales pueden potencialmente reclutar a las GRKs solubles (Krupnick y Benovic 1998).

Recientemente se ha observado que la sustitución de tres residuos cargados negativamente en su cadena lateral (ácidos glutámicos 301-303 localizados en la tercer asa intracelular del receptor α₂-adrenérgico) disminuye la fosforilación y desensibilización del receptor mediada por la GRK2 (Small *et al.*, 2000). Al parecer las GRKs involucradas en fosforilar y desensibilizar a los receptores acoplados a proteínas G requieren de un ambiente ácido en regiones cercanas a los sitios por ser fosforilados, a diferencia de las cinasas activadas por segundos mensajeros, PKC, PKA y PKB, las cuales prefieren un ambiente básico. En este sentido, tanto la cola carboxilo-terminal del receptor AT₁ así como la tercer asa intracelular, aparentemente carecen de un ambiente ácido cercano a las serinas y treoninas, aunque se han propuesto a la Ser³³⁵ y / o Thr³³⁶ como posibles sitios de fosforilación por las GRKs (Sanberg 1994). Definitivamente es la estructura terciaria del receptor en un ambiente soluble un aspecto a considerar muy seriamente para identificar los sitios exactos de fosforilación por estas u otras cinasas.

Proteínas G sensibles a la toxina de pertussis

La toxina de Pertussis debe su nombre al organismo del cual fue extraída (*Bordetella pertussis*) y esta toxina transfiere el grupo ADP-ribosil del NAD⁺ a los residuos de cisteína que se encuentran en el extremo carboxilo terminal de las subunidades alfa de las proteínas G_i / G_o. Las proteínas G modificadas por ADP-ribosilación no son capaces de intercambiar el GDP por el GTP, lo cual resulta en su inactivación. El efecto final es un aumento en los niveles de AMPc intracelulares (García-Sáinz *et al.*, 1992).

Se ha demostrado en hepatocitos que en respuesta a la activación de los receptores AT₁ se inhibe la adenilato ciclasa y se promueve la síntesis y secreción del precursor de la angiotensina II, el angiotensinógeno, a través de proteínas G_i sensibles a la toxina de pertussis (Klett *et al.*, 1990; Bauer *et al.*, 1991).

Los resultados de los ensayos de fosforilación del receptor AT₁ inducida por la angiotensina en células pretratadas con la toxina de pertussis indican que sí hay una participación de las proteínas G sensibles a la toxina y pensamos que muy probablemente estas proteínas sean del tipo G_i. Aparentemente los receptores endógenos AT₁ que se expresan en las células C9 epiteliales de hígado de rata, se fosforilan mediante la activación de proteínas G_i y los resultados obtenidos en la fosforilación homóloga del receptor indican que las proteínas G_q también están involucradas. Cabe mencionar que se estudió la posibilidad de que las proteínas G sensibles a la toxina de pertussis mediaran el efecto de la PI-3K y la PKC en la fosforilación del receptor (resultados no publicados, Fig. 3); sin embargo, no se observó modificación alguna en los efectos de ambos inhibidores (wortmanina y BIM) sobre la fosforilación del receptor inducida por la angiotensina en células pretratadas con la toxina; es decir, los resultados sugieren que tanto G_i como G_q (probablemente a través de sus subunidades βγ) pudieran participar.

Heterodimerización

Actualmente está bien fundamentada la formación de complejos entre receptores acoplados a proteínas G, y aparentemente la presencia de homodímeros y / o heterodímeros de estos receptores en las membranas celulares parece tener un significado funcional. En consecuencia, la información que se obtenga con el estudio de estos complejos ayudará a entender no sólo la capacidad de las células a responder a ciertos estímulos y la manera de integrarlos, ya sean factores de crecimiento, neurotransmisores u hormonas, sino también a comprender los mecanismos transduccionales de comunicación cruzada (del inglés Cross-talk) que ocurren por la activación de distintos receptores, lo cual se ha observado no solamente en este trabajo sino en otros.

Además, los modelos que actualmente se conocen para entender los mecanismos de activación de este tipo de receptores estarán sujetos a un nuevo enfoque si se consideran los complejos moleculares de homodímeros y heterodímeros de receptores de siete dominios transmembranales.

Así, se ha demostrado por ensayos de co-inmunoprecipitación o bien de transferencia de energía entre dos moléculas, la formación de dímeros del receptor β_2 -adrenérgico (Angers *et al.*, 2000), la formación de heterodímeros funcionales del receptor GABA_B-R2 (receptor al ácido γ -aminobutírico) con el receptor GABA_B-R1 (Jones *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998), y más interesante aún, la formación de heterodímeros del receptor de angiotensina II AT₁ con el receptor B₂ de bradicinina en células de músculo liso (AbdAlla *et al.*, 2000). Cuando este último complejo de receptores se activa por la angiotensina II, o bien por la bradicinina, se sinergiza la activación de las proteínas G_{αq} y G_{αi} y aparentemente se altera el proceso de internalización de ambos receptores.

Debido a que en el presente trabajo se observó la desensibilización y fosforilación heterólogas del receptor AT₁, por la activación de los receptores de LPA y de los receptores de vasopresina, expresados endógenamente en la misma célula (C9), no sería raro esperar la interacción directa de alguno de estos dos receptores o bien de algún otro receptor con el receptor AT₁ de angiotensina para

formar heterodímeros funcionales. De hecho, resultados recientes obtenidos en el laboratorio sugieren que el receptor del factor de crecimiento epidérmico podría interactuar con el receptor AT₁. Los resultados muestran que la fosforilación del receptor AT₁ es inducida por el factor de crecimiento epidérmico de una manera dependiente de la concentración, con una estimulación máxima a los 15 minutos, y además que el incremento de la fosforilación del receptor de angiotensina es bloqueado por el inhibidor (AG1478) de la actividad intrínseca de cinasa que posee el receptor de EGF (resultados no publicados, Fig. 4). Actualmente estamos estudiando si la PKC y / o la PI-3K participan en este proceso y, a manera de perspectivas de este trabajo, nos interesa profundizar en la probable formación de heterodímeros funcionales de los receptores de angiotensina AT₁ con los receptores del factor de crecimiento epidérmico o EGFR.

Aportaciones

Las aportaciones de los resultados obtenidos del estudio, "Regulación del receptor AT₁ para la angiotensina II", de la presente tesis de doctorado a la investigación científica puede dividirse en dos partes, en lo general y en lo específico. En lo general, la principal contribución de este trabajo se refiere al avance en el conocimiento de la ciencia en las áreas de bioquímica y biología celular y particularmente, se aportó en los temas de mecanismos de acción hormonal y regulación de receptores de membrana acoplados a proteínas G en células de mamífero. En lo específico, vale la pena mencionar que en este trabajo se demostró por primera vez la participación de la PI-3K en la fosforilación del receptor de angiotensina II, AT₁. Además, se presentó evidencia experimental que sugiere al proceso de fosforilación del receptor AT₁, como uno de los mecanismos de regulación (desensibilización) del receptor aunque muy probablemente no sea el único; lo que argumenta, a favor, del modelo de desensibilización, internalización y resensibilización de los receptores acoplados a proteínas G postulado anteriormente por diversos grupos de investigación.

En el conocimiento de la acción de la hormona, angiotensina II, la aportación es sustancial si se considera que en algunas enfermedades vasculares y cardíacas, como la hipertensión, la hipertrofia cardiovascular, el infarto al miocardio, etc, los receptores AT₁ están directamente implicados y cualquier aportación en el conocimiento de la regulación de estos receptores ayudará a entender como aliviar estas enfermedades, sin los no deseados efectos secundarios. Por ejemplo, se ha observado que en el tratamiento de los pacientes hipertensos con los inhibidores (captopril, enalapril) de la enzima convertidora de angiotensina y con el antagonista (losartan) del receptor AT₁, la presión sanguínea (sistólica y diastólica) disminuye eficientemente, sin embargo, estos fármacos también causan la tos seca (Saavedra y Timmermans 1994).

CONCLUSIONES

La respuesta de incremento del calcio intracelular inducida por la angiotensina II en las células C9 , disminuye a causa de la desensibilización homóloga del receptor AT₁ inducida por la constante activación de los receptores con la angiotensina II y de la desensibilización heteróloga del receptor AT₁ causada por la activación de los receptores del ácido lisofosfatídico y de vasopresina y la activación de las cinasas activadas por segundos mensajeros, PKA y PKC.

La fosforilación homóloga del receptor AT₁ inducida por la angiotensina II es mediada en parte por la proteína cinasa C, la cinasa de fosfoinosítidos PI-3K y la PKB y por proteínas G sensibles (G_i / G_o) e insensibles (G_q) a la toxina de Pertussis. Muy probablemente, otras cinasas como las GRKs o cinasas de receptores acoplados a proteínas G pueden contribuir en la fosforilación del receptor AT₁ en las células C9.

En el conocimiento de la acción de la hormona, angiotensina II, la aportación es sustancial si se considera que en algunas enfermedades vasculares y cardíacas, como la hipertensión, la hipertrofia cardiovascular, el infarto al miocardio, etc, los receptores AT_1 están directamente implicados y cualquier aportación en el conocimiento de la regulación de estos receptores ayudará a entender como aliviar estas enfermedades, sin los no deseados efectos secundarios. Por ejemplo, se ha observado que en el tratamiento de los pacientes hipertensos con los inhibidores (captopril, enalapril) de la enzima convertidora de angiotensina y con el antagonista (losartan) del receptor AT_1 , la presión sanguínea (sistólica y diastólica) disminuye eficientemente, sin embargo, estos fármacos también causan la tos seca (Saavedra y Timmermans 1994).

CONCLUSIONES

La respuesta de incremento del calcio intracelular inducida por la angiotensina II en las células C9 , disminuye a causa de la desensibilización homóloga del receptor AT_1 inducida por la constante activación de los receptores con la angiotensina II y de la desensibilización heteróloga del receptor AT_1 causada por la activación de los receptores del ácido lisofosfatídico y de vasopresina y la activación de las cinasas activadas por segundos mensajeros, PKA y PKC.

La fosforilación homóloga del receptor AT_1 inducida por la angiotensina II es mediada en parte por la proteína cinasa C, la cinasa de fosfoinosítidos PI-3K y la PKB y por proteínas G sensibles (G_i / G_o) e insensibles (G_q) a la toxina de Pertussis. Muy probablemente, otras cinasas como las GRKs o cinasas de receptores acoplados a proteínas G pueden contribuir en la fosforilación del receptor AT_1 en las células C9.

La fosforilación heteróloga del receptor AT_1 inducida por la activación de los receptores del ácido lisofosfatídico y de vasopresina es mediada principalmente por la proteína cinasa C. Además, la PKA participa en la fosforilación del receptor.

La desensibilización tanto homóloga como heteróloga del receptor AT_1 inducida por la angiotensina II y por la activación de otros receptores acoplados a proteínas G, como receptores del ácido lisofosfatídico y de vasopresina, co-relaciona con la fosforilación del receptor AT_1 . La co-relación de ambos procesos sugiere que la desensibilización del receptor AT_1 en las células C9 es resultado de la fosforilación del receptor, semejante a la desensibilización y la fosforilación descritas para otros receptores acoplados también a proteínas G (Lohse *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1991).

Con base en conceptos actuales de los procesos de fosforilación y desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la siguiente secuencia de eventos en la fosforilación del receptor endógeno AT_1 inducida por la angiotensina II en la línea celular C9: 1) La activación de los receptores AT_1 por la angiotensina II estimula tanto a proteínas G insensibles a la toxina de Pertussis, probablemente $G_{q/11/14}$, como a proteínas G sensibles a la toxina de Pertussis, probablemente de la familia de G_i ; 2) Las proteínas G activadas catalizan la reacción de intercambio de GDP por GTP lo que resulta en la disociación de las subunidades G_α y los dímeros $G\beta\gamma$; 3) Los dímeros $\beta\gamma$ liberados en el citosol reclutan a las cinasas (GRKs) que fosforilan a los receptores AT_1 y promueven la unión de las β -arrestinas y estabilizan el estado desacoplado del receptor (Krupnick JG y Benovic JL, 1998); 4) Los dímeros $\beta\gamma$ liberados también pueden activar a la PI-3K, cuya actividad lleva a la activación de la PKB y de la PKC y la fosforilación adicional del receptor AT_1 , lo cual pudiera contribuir a la desensibilización del receptor; 5) La activación de $G_{\alpha q}$ activa a la fosfolipasa C, la que genera el diacilglicerol el cual a su vez activa a la PKC contribuyendo a la fosforilación del receptor AT_1 (Fig. 8).

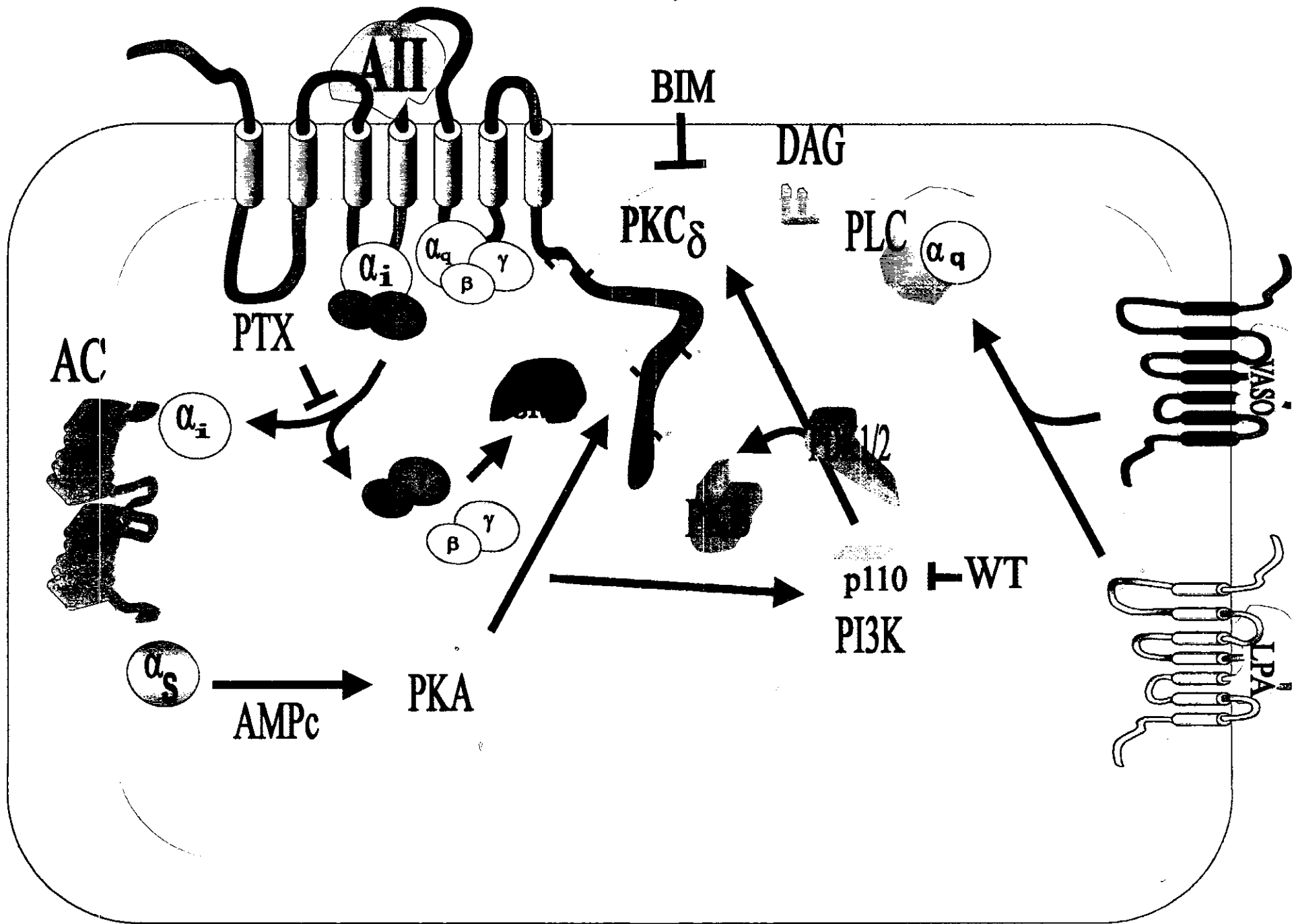


Fig. 8 Conclusiones

Fig. 8

Conclusiones.

En el esquema se muestra un modelo de la activación, fosforilación homóloga y heteróloga del receptor AT₁ de siete dominios transmembranales acoplado a las proteínas G_q y G_i en las células C9. **AII**, angiotensina II, **LPA**, ácido lisofosfatídico; **Vaso**, vasopresina; **AC**, adenilil ciclasa; **DAG**, diacilglicerol; **PLC**, fosfolipasa C; **PKA**, proteína cinasa A; **PKB**, proteína cinasa B; **PKC**, proteína cinasa C; **GRKs**, cinasas de receptores acoplados a proteínas G; **PI3K**, cinasa de fosfoinosítidos; **PDK1/2**, cinasas dependientes de fosfoinosítidos; **AMPc**, adenosina monofosfato cíclica; α_q y α_i , subunidades alfa de las proteínas G heterotriméricas; $\beta\gamma$, dímeros beta-gamma de las proteínas G heterotriméricas; **PTX**, toxina pertussis; **BIM**, bisindolilmaleimida I (inhibidor de la PKC), **WT**, wortmanina (inhibidor de la PI-3K).

REFERENCIAS

AbdAlla S, Lothar H and Quittner U (2000) AT₁-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**:94-98.

Abdellatif MM, Newbauer CF, Lederer WJ and Rogers TB (1991) Angiotensin induced desensitization of the phosphoinositide pathway in cardiac cells occurs at the level of the receptor. *Circ Res* **69**:800-809.

Adams MJ and Cory S (1998) The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* **281**:1322-1326.

Alexander SPH and Peters JA (2000) 2000 Receptor and ion channel nomenclature supplement. *Ti PS* **11** th Ed. 19 p.

Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M and Bouvier M (2000) Detection of β_2 -adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:3684-3689.

Balmforth AJ, Shepherd FH, Warburton P and Ball SG (1997) Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT_{1A} receptor. *Brit J Pharmacol* **122**:1469-1477.

Bauer PH, Chiu AT and Garrison JC (1991) DuP 753 can antagonize the effects of angiotensin II in rat liver. *Mol Pharmacol* **39**:579-585.

Benovic JL, Bouvier M, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Regulation of adenylyl cyclase-coupled β -adrenergic receptors. *Annu Rev Cell Biol* **4**:405-428.

Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P and Kersten H (1992) Cloning and characterization of a human angiotensin II type-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **183**:989-995.

Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM and Baker KM (1994) Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT_{1A} receptor activates transcription factor Stat91 and/or a related protein. *J Biol Chem* **265**:31443-31449.

Biggs WH, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, and Arden KC (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:7421-7426.

Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlstroem I, Lydon N and deGasparo M (1992) The angiotensin AT₂ receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **183**:206-211.

Boulay G, Chretien L, Richard DE and Guillemette G (1994) Short-term desensitization of the angiotensin II receptor of bovine adrenal glomerulosa cells corresponds to a shift from a high to a low affinity state. *Endocrinology* **135**:2130-2136.

Bouscarel B, Augert G, Taylor SJ and Exton JH (1990) Alterations in vasopressin and angiotensin II receptors and responses during cell culture of rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* **1055**:265-272.

Brodie C, Kuperstein I, Acs P and Blumberg PM (1998) Differential role of specific PKC isoforms in the proliferation of glial cells and the expression of the astrocytic markers GFAP and glutamine synthetase. *Brain Res Mol Brain Res* **56**(1-2):108-17.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J and Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**:857-868.

Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, de-Gasparo M and Goodfriend T (1991) Nomenclature for Angiotensin Receptors. *Hypertension* **17**:720-721.

Burns KD, Inagami T, Harris RC (1993) Cloning of a rabbit kidney cortex AT₁ angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol* **264**:1645-1654.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S and Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**:1318-1321.

Casas-González P, Vázquez-Prado J and García-Sáinz JA (2000) Lysophosphatidic acid modulates α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation and function. Roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol* **57**:1027-1033.

Chang RS and Lotti VJ (1990) Two distinct angiotensin II receptor binding sites in rat adrenal revealed by new selective nonpeptide ligands. *Mol Pharmacol* **37**:347-351.

Cheng X, Ma Y, Moore M, Hemmings BA and Taylor SS (1998) Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:9849-9854.

Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ and Carini DJ (1989) Identification of Angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* **165**:196-203.

Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS and Toker A (1998) Regulation of protein kinase C zeta by PI3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* **8**:1069-1077.

Clark RB, Kunkel MW, Friedman J, Goka TJ and 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**:1442-1452.

Corvera S and García-Sáinz JA (1984) Phorbol esters inhibit α 1-adrenergic regulation of hepatocyte metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **119**:1128-1133.

Corvera S, Schwarz KR, Graham RM, García-Sáinz 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.

Debburman SK, Kunapuli P, Benovic JL and Hosey MM (1995) Agonist-dependent phosphorylation of human muscarinic receptors in *Spodoptera frugiperda* insect cell membranes by G protein-coupled receptor kinases. *Mol Pharmacol* **47**:224-233.

Denning MF, Dlugosz AA, Williams EK, Szallasi Z, Blumberg PM, Yuspa SH (1995) Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ* **6**(2):149-57.

Distanik MH (1994) Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res* **210**:287-297.

Douglas JG, Romero M and Hopfer U (1990) Signalling mechanisms coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium. *Kidney Int Suppl* **30**:543-547.

Downward J (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10**:262-267.

Downward J (1999) How BAD phosphorylation is good for survival. *Nature Cell Biol.* **1**:E33-E35.

Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG and Martin MM (1992) Isolation of two distinct type 1 angiotensin II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun* **184**:1067-1073.

Enari M, Sadahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S (1998) A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**:43-50.

Ferguson SS, Zhang J, Barak LS and Caron MG (1997) Pleiotropic role for GRKs and β -arrestins in receptor regulation. *News Physiol Sci* **12**:145-152.

Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant EA (1991) Angiotensin (1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* **18**(5):III126-III133.

Feuillan PP, Millan MA and Aguilera G (1993) Angiotensin II binding sites in the rat fetus: characterization of receptor subtypes and interaction with guanyl nucleotides. *Regul Pept* **44**:159-169.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC and Toker A (1997a) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3, 4-bisphosphate. *Science* **275**:665-668.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997b) PI-3K: downstream AKT ion blocks apoptosis. *Cell* **88**:435-437.

Fukumoto S, Nishizawa Y, Hosoi M, Koyama H, Yamakawa K, Ohno S, Morii H (1997) Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *J Biol Chem* **272**(21):13816-22.

Furuta H, Guo DF and Inagami T (1992) Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **183**:8-13.

Gáborik Z, Szaszák M, Szidonya L, Balla B, Paku S, Catt JK, Clark LJA, Hunyady L (2001) β -arrestin and Dynamin-dependent endocytosis of the AT₁ angiotensin receptor. *Mol Pharmacol* **59**:239-247.

García-Sáinz JA and Olivares-Reyes JA (1995) Glycyl-Histidyl-Lysine interacts with the angiotensin II AT₁ receptor. *Peptides* **16**(7):1203-1207.

García-Sáinz JA, García-Caballero A and González-Espinosa C (1998) Angiotensin AT₁ receptors in Clone 9 rat liver cells: calcium signaling and *c-fos* expression. *Eur J Pharmacol* **362**:235-243.

García-Sáinz JA, Romero-Avila MT, Ruiz-Arriaga A, Ruiz-Puente J, Agundis C, Ortiz V and Isibasi A (1992) Characterization and detoxification of an easily prepared acellular pertussis vaccine. Antigenic role of the A protomer of pertussis toxin. *Vaccine* **10**:341-344.

Geiger T, Muller M, Dean NM, Fabbro D (1998) Antitumor activity of a PKC-alpha antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted into nude mice. *Anticancer Drug Des* **13**(1):35-45.

Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH and Benovic JL (1996) β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. *Nature* **383**:447-450.

Gradi EF, Sechi LA, Griffin CA, Scahmbelan M and Kalinyak JE (1991) Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* **88**:921-933.

Griendling KK, Lassegue B and Wayne RA (1996) Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**:281-306.

Haddock JR, Port JD, Gelman MS and Malbon CC (1992) Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of β_2 -adrenergic receptors in response to insulin. *J Biol Chem* **267**:26017-26023.

Hall KL, Hanesworth J M, Ball AE, Felgenhaner GO, Hosick HL and Harding JW (1993) Identification and characterization of a novel angiotensin binding site in a cultured vascular smooth muscle cells that is specific for the hexapeptide (3-8) fragment of angiotensin II, angiotensin IV. *Regul. Pept* **44**:225-232.

Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S and Saito T (1999) PKC ν , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ . *Biochim Biophys Acta* **1450**(1):99-106.

Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, and Kobilka BK (1997) Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT $_1$ and AT $_2$ receptors: Evidence for selective sorting of receptors and ligand. *Mol Endocrinol* **11**:1266-1277.

Hunyady L, Bor M, Balla T and Catt KJ (1994) Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT $_1$ angiotensin receptor. *J Biol Chem* **269**:31378-31382.

Houslay MD (1991) Crosstalk: A pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur J Biochem* **195**:9.

Ishizaka N, Alexander RW, Laursen JB, Kai H, Fukui T, Oppermann M, Lefkowitz RJ, Lyons PR and Griendling KK (1997) G protein-coupled receptor kinase 5 in cultured vascular smooth muscle cells and rat aorta. Regulation by angiotensin II and hypertension. *J Biol Chem* **272**: 32482-32488.

Itazaki K, Shigeri Y, Fujimoto M (1993) Molecular cloning and characterization of the angiotensin subtype in porcine aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **245**:147-156.

Iwai N and Inagami T (1992) Identification of two subtypes in the rat type 1 angiotensin II receptor. *FEBS Lett* **298**:257-260.

Jackson EK and Garrison JC (1996) Chapter 31. Renin and Angiotensin, in *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddpm RW, and Gilman AG, eds.) pp. 733-758, McGraw-Hill, New York.

Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA and Gerald C (1998) GABA $_B$ receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA $_B$ R1 and GABA $_B$ R2. *Nature* **396**:674-678.

Kahar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC and Neill JD (1992a) Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNA's: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **183**:1090-1096.

Kahar SS, Riel KK and Neill JD (1992b) Differential expression of Angiotensin II receptor subtype mRNA's in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* **185**:688-692.

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S and Inui H (1993) Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* **268**:24543-24546.

Kang J, Posner P and Summers C (1992) Angiotensin-II type-1 (AT₁) and angiotensin II type-2 (AT₂) receptors mediated changes in potassium currents in cultured neurons:role of intracellular calcium. *FASEB J* **6**:1012-1021

Kennelly PJ and Krebs EG (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* **266**(24):15555-15558.

Keranen LM, Dutil EM and Newton AC (1995) Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* **5**(12):1394-1403.

Kerr RFJ and Harmon VB (1991). Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death. Cold Spring Harbor Laboratory Press.USA.

Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R and Hiwada K (1992) Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptors subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* **188**:446-452.

Klett C, Muller F, Gierschik P, Hackenthal E (1990) Angiotensin II stimulates angiotensinogen synthesis in hepatocytes by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *FEBS Lett* **259**:301-304

Klippel A, Kavanaugh WN, Pot D and Williams LT (1997) A specific product of phosphatidylinositol-3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* **17**:338-344.

Koch WJ, Inglese J, Stone WC and Lefkowitz RJ (1993) The binding site for the beta gamma subunits of heterodimeric G protein of the β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**:8256-8260.

Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ and Dzau VJ (1994) Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun* **203**:1842-1850.

Kops GJ, De Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL and Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**:630-634.

Kozlowski MR, Arcuri M and Zynardi L (1993) Comparison of the binding and functional actions of angiotensin agonists in clone 9 cells: evidence for angiotensin II receptor heterogeneity. *J Receptor Res* **13**:1031-1040.

Kraft AS and Anderson WB (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* **301**:621-623.

Kronfeld I, Kazimirsky G, Lorenzo PS, Garfield SH, Blumberg PM and Brodie C (2000) Phosphorylation of protein kinase C δ on distinct tyrosine residues regulates specific cellular functions. *J Biol Chem* **275**(45):35491-35498.

Krupnick, JG and Benovic, JL (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289-319.

Leff P (1995) The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* **16**:89-97.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, and Costa T (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* **14**:303-307.

Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P and Parker PJ (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK. *Science* **281**:2042-2045.

Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. *J Biol Chem* **265**:3202-3211.

Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC and Bernstein KE (1994) Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **269**:10935-10939.

McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ and Lefkowitz RJ (2000) beta-arrestin 2: A receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**(5496):1574-1577

Menard L, Ferguson SS, Barak LS, Bertrand L, Premont RT, Colapietro AM, Lefkowitz RJ and Caron MG (1996) Members of the G protein-coupled receptor kinase family that phosphorylate the β_2 -adrenergic receptor facilitate sequestration. *Biochemistry* **35**: 4155-4160.

Mellor H and Parker PJ (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* **332**:281-292.

Mischak H, Pierce JH, Goodnight J, Kazanietz MG, Blumberg PM and Mushinski JF (1993) Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta. *J Biol Chem* **268**(27):20110-20115.

Molloy CJ, Taylor DS and Weber H (1993) Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* **268**:7338-7345.

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE and Dzau VJ (1993) Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* **268**:24539-24542.

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

Murga C, Laguinge L, Wetzker R, Cuadrado A and Gutkind JS (1998) Activation of Akt/protein kinase B by G Protein-coupled receptors. A role for α and $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol 3-OH kinase γ . *J Biol Chem* **273**:19080-19085.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS and Bernstein KE (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**:233-236.

Nakanishi H, Brewer KA and Exton JH (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *J Biol Chem* **268**:13-16.

Newton AC (1995) Protein kinase C: Structure, function and regulation. *J Biol Chem* **270**:28495-28498.

Newton AC (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* **9**:161-167.

Obata T, Yaffe MB, Leparo GG, Piro ET, Maegawa H, Kashiwagi A, Kikkawa R and Cantley LC (2000) Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J Biol Chem* **275**(46):36108-36115.

Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW and Lefkowitz RJ (1996) Phosphorylation of the type IA angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem* **271**:13266-13272.

Olivares-Reyes JA, Jayadev S, Hunyady L, Catt KJ and Smith RD (2000) Homologous and heterologous phosphorylation of the AT₂ angiotensin receptor by protein kinase C. *Mol Pharmacol* **58**(5):1156-1161.

Palczewski K (1997) GTP-binding-protein-coupled receptor kinases - two mechanistic models. *Eur J Biochem* **248**: 261-269.

Parekh DB, Ziegler W and Parker PJ (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* **19**(4):496-503.

Parmentier JH, Muthalif MM, Nishimoto AT, Malik KU (2001a) 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid mediates angiotensin ii-induced phospholipase D activation in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **2**(2):623-9.

Parmentier JH, Muthalif MM, Saeed AE, Malik KU (2001b) Phospholipase D activation by norepinephrine is mediated by 12(S)-, 15(S)-, and 20-hydroxyeicosatetraenoic acids generated by stimulation of cytosolic phospholipase A₂: Tyrosine-phosphorylation of phospholipase D2 in response to norepinephrine. *J Biol Chem* Feb 7

Paxton WG, Marrero MB, Klein JD, Delafontaine P, Berk BC and Bernstein KE (1994) The angiotensin II AT1 receptor is tyrosine and serine phosphorylated and can serve as a substrate for the src family of tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:260-267.

Peach MJ (1977) Renin-Angiotensin system: Biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* **57**:313-370.

Peach MJ (1979) Structural Features of angiotensin II which are important for biologic activity. *Kidney Intl* **15**:S3-S6.

Pei G, Samama P, Lohse M, Wang M, Codina J and Lefkowitz RJ (1994) A constitutively active mutant beta 2-adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:2699-2702.

Petit XP, Goubern M, Diolez P, Susin AS, Zamzami N and Kroemer G (1998) Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS* **426**:111-116.

Pfeilschifter J and Bauer C. (1986) Pertussis toxin abolishes angiotensin II-induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin synthesis in rat renal mesangial cells. *Biochem J* **236**:289-294.

Phillips MI (1978) Angiotensin II in the brain. *Neuroendocrinology* **25**:354-377.

Pitcher JA, Freedman NJ and Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Ann Rev Biochem* **67**: 653-692.

Premont RT, Inglese J and Lefkowitz RJ (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* **9**: 175-182.

Qian H, Pipolo L and Thomas WG (1999) Identification of protein kinase C phosphorylation sites in the angiotensin II (AT1A) receptor. *Biochem J* **343**:637-644.

Rameh LE and Cantley LC (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**:8347-8350.

Ren Q, Kurose H, Lefkowitz RJ and Cotecchia S (1993) Constitutively active mutants of the alpha-2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **268**(22):16483-16487.

Richard DE, Laporte SA, Bernier SG, Leduc R and Guillemette G (1997) Desensitization of AT₁ receptor-mediated cellular responses requires long term receptor down-regulation in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **138**(9):3828-3835.

Richardson RM, Kim C, Benovic JL and Hosey MM (1993) Phosphorylation and desensitization of human m2 muscarinic cholinergic receptors by two isoforms of the adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**: 13650-13656.

Roberts KA, Krebs LT, Kramár EA, Shaffer MJ, Harding JW and Wright JW (1995) Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding site and differential c-fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats. *Brain Res* **682**:13-21.

Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ and Lohse MJ (1991) Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14):6201-4

Saavedra MJ and Timmermans MWMBP (1994) Angiotensin Receptors. Plenum Press. NY, USA. 413 pp.

Samama P, Cotecchia S, Costa T and Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **268**(7):4625-4636.

Sandberg K (1994) Structural analysis and regulation of angiotensin II receptors. *Trends Endocrinol Metab* **5**:28-35.

Sandberg K, Ji H, Clark AJL, Shapira H and Catt KJ (1992) Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J Biol Chem* **267**:9455-9458.

Sasaki K, Yamano Y, Bardham S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y and Inagami T (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351**:230-232.

Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK and Dzau VJ (1992) Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT₁) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* **185**:253-259.

Scaramellini C and Leff P (1998) A three-state receptor model: predictions of multiple agonist pharmacology for the same receptor type. *Ann N Y Acad Sci* **861**:97-103.

Small KM, Brown KM, Forbes SL, Liggett SB (2000) Polymorphic deletion of three intracellular acidic residues of the α_{2B} -adrenergic receptor decreases GRK-mediated phosphorylation and desensitization. *J Biol Chem* **276** (7):4917-4922.

Smith RD, Baukal AJ, Zolyomi A, Gaborik Z, Hunyady L, Sun L, Zhang M, Chen H-C and Catt KJ (1998a) Agonist-induced phosphorylation of the endogenous AT₁ angiotensin receptor in bovine adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* **12**:634-644.

Smith RD, Hunyady L, Olivares-Reyes JA, Mihalik B, Jayadev S and Catt KJ (1998b) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT_{1a} receptor is localized to a serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol Pharmacol* **54**:935-941.

Staehelin M y Simons P (1982) Rapid and reversible disappearance of β -adrenergic cell surface receptors. *EMBO J* **1**:187-190.

Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J and Hawkins PT (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**:710-714.

Summers C and Myers LM (1991) Angiotensin II decreases cGMP levels in neuronal cultures from rat brain. *Am J Physiol* **260**:C79-C87.

Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T (1992) Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 Angiotensin receptor *Biochem Biophys Res Commun* **183**:910-916.

Takei Y, Hasegawa Y, Watanabe TX, Nakajima K and Hazon N (1993) A novel angiotensin I isolated from an elasmobranch fish. *J. Endocrinol.* **139**: 281-285.

Tang H, Guo DF, Porter JP, Wanaka Y and Inagami T (1998) Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res* **82**:523-531.

Tang H, Shirai H and Inagami T (1995) Inhibition of protein kinase C prevents rapid desensitization of type 1B angiotensin II receptor. *Circ Res* **77**:239-248.

Tewksbury DA. 1990. Angiotensinogen: Biochemistry and Molecular Biology. In Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis and Management, ed. JH Laragh, BM Brenner, **75**:1197-216. NY:Raven.2360 pp.

Thomas WG (1999) Regulation of angiotensin II type 1 (AT₁) receptor function. *Reg Pep* **79**: 9-23.

Thomas WG, Baker KM, Booz GW and Thekkumkara TJ (1996) Evidence against a role for protein kinase C in the regulation of the angiotensin II (AT_{1A}) receptor. *Eur J Pharmacol* **295**:119-122.

Thomas WG, Qian H, Chang C-S, Karnik S (2000) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin II (AT_{1A}) receptor requires generation of a conformation that is distinct from the inositol phosphate-signaling state. *J Biol Chem* **275**(4):2893-2900.

Thornberry NA and Lazebnik Y (1998) Caspases: Enemies Within. *Science* **281**:1312-1316.

Tsutsumi K and Saavedra JM (1991) Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *Am J Physiol* **261**:R209-216.

Vanhaesebroeck B and Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* **253**:239-254.

Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FM and Saavedra JM (1991) Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun* **179**:1361-1367.

Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, Walsh RA and King GL (1997) Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(17):9320-9325.

Way KJ, Chou E, King GL (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci.* **21**(5):181-7.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Westphal RS, Backstrom JR, Sanders-Bush E (1995) Increased basal phosphorylation of the constitutively active serotonin 2C receptor accompanies agonist-mediated phosphorylation. *Mol Pharmacol* **48**(2):200-205.

White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, and Marshall FH (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature* **396**:679-682.

Whitebread S, Mele M, Kamber B and de Gasparo M (1989) Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptors subtypes. *Biochem. Biophys Res Commun* **163**:284-291.

Wolf M, Levine H, May WS Jr, Cuatrecasas P and Sahyoun N (1985) A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca²⁺ and phorbol esters. *Nature* **317**:546-549.

Wymann MP and Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim Biophys Acta* **1436**:127-150.

Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Menard L and Caron MG (1996) Dynamin and β -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271**:18302-18305.

Zou H, Henzel JW, Liu X, Lutschg A and Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C.elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**:405-413.