

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**EFFECTO DEL TGF- β SOBRE LOS
RECEPTORES α_{1B} -ADRENERGICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A
M. en IBB. MARIA TERESA ROMERO AVILA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESUS ADOLFO GARCIA - SAINZ

MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y con el apoyo financiero de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (36230-N) y Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN2051999)

A José Andrés
por su cariño y paciencia

A mis hijos Pável y Nadia
por ser mis incondicionales

A mis papás Margarita y Salvador
por estar siempre ahí, para nosotros

A mis hermanos:

Margarita, Eréndira, Janine, Salvador, Nohemí e Israel
por su constante apoyo en todo

Para mis sobrinos y cuñados

Con cariño

Para mis suegros Lilibian y Andrés

Por su apoyo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz por su confianza hacia mi trabajo, por haberme permitido llevar a cabo este proyecto de tesis, así como, por sus constantes muestras de apoyo para la finalización del mismo.

A mi comité tutorial formado por: la Doctora Victoria Chagoya de Sánchez, la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y el Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz, gracias por sus constantes críticas y consejos en los diferentes proyectos que presenté a lo largo de mis tutoriales.

Al jurado revisor el que tan pacientemente realizó la revisión crítica del manuscrito final de esta tesis:

Dra. Rosario Muñoz Clares
Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Dra. Marcia Iriarte Urdanivia
Dra. Marina Macías Silva
Dr. Enrique Ortega Soto
Dr. Fernando López Casillas

A Carlos Fabián Flores Jasso por su colaboración en el trabajo experimental.

A la Dra. Beatriz Aguilar por su ayuda en la revisión del manuscrito final y su constante ayuda en la computadora y al M en C. Marco Antonio Briones por la realización de las figuras de la tesis.

A Ma. Guadalupe Jiménez, Ma. Guadalupe Pérez porque con su trabajo siempre facilitan el nuestro, además de estar siempre conmigo.

A mis amigos de siempre:

Marina Macias-Silva, Claudia González Espinosa, Luz del Carmen Medina Bañuelos, Erika Rendón Huerta, Ma. Eugenia Torres Marqués, Concepción Agundis, Lupita Jiménez, Lupita Pérez, Mirella Rodríguez, Lupita Ramírez, Dominga Vera, Ma. Del Socorro Burgos Serrano, Graciela Romero Aguilar, Armando Torres, Adelfa Ángeles, Alejandra Peláes, Pablo Arenas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio:

Ekaterina Rodríguez Pérez, Tzindilu Molina Muñoz, Francisco Vázquez, Alejandro Ruíz, María José García-Sáinz, Christian, Verónica, Francisco y Bety.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
DESENSIBILIZACIÓN	7
<i>Desensibilización Homóloga</i>	7
<i>Regulación por GRKs</i>	10
<i>Función de las β-arrestinas en la regulación los GPCRs</i>	13
<i>Regulación del receptor $\alpha_{1\beta}$-adrenérgico</i>	15
<i>Desensibilización Heteróloga</i>	16
<i>Regulación por la proteína cinasa A</i>	16
<i>Regulación por la proteína cinasa C</i>	17
<i>Regulación cruzada entre los receptores $\alpha_{1\beta}$-adrenérgicos y otros receptores acoplados a proteínas G</i>	18
LA PROTEÍNA CINASA C (PKC)	20
LA FOSFATIDILINOSITOL 3-CINASA (PI3-K)	23
<i>Inhibidores de la PI3-K</i>	26
LA FAMILIA DEL TGF-β	28
<i>Los receptores para el TGF-β</i>	33
<i>Las proteínas Smads</i>	34
<i>Regulación cruzada entre el sistema de señalización del TGF-β y otras vías de señalización.</i>	36
<i>Regulación cruzada entre el TGF-β y los receptores acoplados a proteínas G</i>	38
JUSTIFICACIÓN	39
OBJETIVO GENERAL	41
<i>Objetivos Particulares</i>	41
HIPÓTESIS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42
RESULTADOS	46
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63

Resumen

Una forma de regulación de la actividad de los receptores de membrana es a través de su fosforilación por distintas proteínas cinasas. Nuestro grupo ha demostrado previamente que los receptores α_{1b} -adrenérgicos son regulados en respuesta a la activación de otros receptores acoplados a proteínas G como por, ejemplo, los receptores para la bradicidina y la endotelina, o regulados por receptores con actividad cinasa de tirosina, como son los receptores para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) o los receptores del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). En este trabajo se reporta que los receptores con actividad de cinasa de serina/treonina, como los del Factor de Crecimiento Transformante- β "TGF- β " (Transforming Growth Factor- β) son capaces de ejercer también este tipo de regulación sobre los receptores α_{1b} -adrenérgicos expresados establemente en células Rat-1. La estimulación de las células Rat-1 con TGF- β induce la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos, lo que se traduce en una desensibilización de la respuesta α_{1b} -adrenérgica, evidenciada por una disminución de la respuesta a norepinefrina (el agonista natural), por la elevación del calcio intracelular (Ca^{2+}) y por la producción de fosfatos de inositol (IP_3). Algunos de los inhibidores de la proteína cinasa C (PKC) y de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) bloquean la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos inducida por el TGF- β . Además, en la cotransfección de los receptores α_{1b} -adrenérgicos y de la mutante dominante negativa de la PI3-K ($\Delta p85$) en la línea celular COS-1 se observó que se bloquea la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos inducida por el TGF- β . Nuestros datos sugieren que la activación de los receptores para el TGF- β estimulan la actividad de la PI3-K, lo cual lleva probablemente a la activación de la PKC; entonces la PKC fosforila y desensibiliza a los receptores α_{1b} -adrenérgicos.

Abstract

One form of regulation of the activity of the membrane receptors is through its phosphorylation catalyzed by of distinct protein kinases. Our group has previously demonstrated that the receptors α_{1b} -adrenergics are regulated, in response to the activation of others G protein-coupled receptors. For example, the receptors for bradykinin and endothelin, like in others, as receptors with intrinsic tyrosine kinase activity such as those for epidermal growth factor (EGF), or platelet-derived growth factor (PDGF). In this study it is reported that the receptors with activity of serine/threonine kinases, such as those the transforming growth factor β (TGF- β) are capable to exert this type of regulation over α_{1b} -adrenergic in Rat-1 fibroblasts stably expressing these adrenoceptors. The stimulation of the cells Rat-1 with TGF- β induced phosphorylation/desensitization α_{1b} -adrenergic receptors. We observed that the TGF- β mediated α_{1b} -adrenergic receptor phosphorylation was associated with a decrease in the maximal adrenergic effect by noradrenaline (the natural agonist) in the elevation of the intracellular calcium (Ca^{2+}) and as indicated by a reduction in the adrenergic-mediated production of [3H] inositol phosphates. Some of the protein kinase C (PKC) inhibitors and the phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) inhibitors blocked the phosphorylation of α_{1b} -adrenergic receptors. Our data suggests the activation of the receptors for the TGF- β stimulate the activity of the PI3-K, in which probably carries the activation of the PKC, and then the PKC phosphorylate and desensitization the α_{1b} -adrenergic receptors. Phosphorylation of α_{1b} -adrenergic receptors by TGF- β was also observed in Cos-1 cells transfected with the receptor. Co-transfection of the dominant-negative mutant of the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase ($\Delta p85$) inhibited the phosphorylation of α_{1b} -adrenergic receptors induced by TGF- β . Our results indicate that activation of TGF- β receptors induces α_{1b} -adrenergic receptor phosphorylation and desensitization. The data suggest that phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C play key roles in this effect of TGF- β .

Introducción

La familia de receptores acoplados a proteínas G, GPCRs, (por sus siglas en inglés, G Proteins Coupled Receptors), está formada por una gran cantidad de receptores diferentes, cuya función principal es la transmisión de la información del ambiente extracelular al interior de la célula. Esta familia incluye receptores para muchas moléculas señales: como hormonas, neurotransmisores, péptidos, moléculas de olores y sabores, fotones, así como, para iones por ejemplo: de Ca^{2+} y K^+ . De acuerdo a una reciente estimación entre 1000-2000 genes codifican para esta familia de receptores lo que representa el 1% del genoma humano (Bockaert et al., 1999).

Los GPCRs comparten una estructura común constituida por una región amino terminal extracelular, siete hélices que atraviesan la membrana celular unidas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares y una región carboxilo terminal citoplásmica. A los receptores acoplados a proteínas G también se les denomina receptores de siete dominios transmembranales.

Las señales extracelulares son transducidas hacia el citoplasma vía la interacción de los ligandos con sus receptores. La activación del receptor se produce por la interacción con su ligando (también llamado agonista) lo que induce cambios en la conformación en el receptor que le permiten acoplarse con proteínas G y formar complejos de alta afinidad agonista-receptor-proteína G. Dicha asociación promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G. Esto causa la disociación de las proteínas G heterotriméricas en sus subunidades: la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ son capaces de regular la actividad de un gran número de moléculas efectoras: la adenilato ciclasa, isoformas diferentes de la fosfolipasa C_β (PLC_β), canales iónicos, proteínas cinasas de tirosina, etc. La unión del GTP a la subunidad α y la disociación del complejo $\beta\gamma$ también producen una disminución en la afinidad del receptor por el agonista. La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α hidroliza el GTP a GDP, por lo que el sistema regresa a su estado basal (Gilman, 1987), ver Figura 1.

La activación de la adenilato ciclasa o de la PLC_β generan los segundos mensajeros AMPc y diacilglicerol en el primer caso, el inositol 1,4,5 trisfosfato y movilización de Ca^{2+} , en el segundo, modificando el medio intracelular y produciendo una cascada de

fosforilaciones/desfosforilaciones que dan por resultado una gran variedad de respuestas celulares.

Las respuestas celulares a la epinefrina y la norepinefrina se llevan a cabo por la activación de los receptores de membrana llamados adrenérgicos, los cuales pertenecen a los GPCRs, a la fecha se han identificado 9 subtipos. Basándose en sus propiedades farmacológicas, bioquímicas y en el sistema de transducción de señales al que se encuentran acoplados, los receptores adrenérgicos se han dividido en tres familias: α_1 (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}); α_2 (α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}) y β (β_1 , β_2 y β_3). Los α_2 y los β están acoplados al sistema de la adenilato ciclasa y los α_1 al recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} .

Por convención y de acuerdo a la "International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update" se nombran a los receptores α_1 -adrenérgicos nativos con letras mayúsculas en los subíndices y a los receptores α_1 -adrenérgicos clonados con letras minúsculas en los subíndices (Hieble et al., 1995).

Los receptores α_{1b} -adrenérgicos, motivo de esta tesis, ejercen su acción a través del sistema de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} . Este sistema de señalización se activa por la interacción del receptor con el agonista (norepinefrina), favoreciendo la interacción con la proteína G_q (Cotecchia et al., 1992) lo que ocasiona la activación de la fosfolipasa C (PLC) cuyo sustrato específico es el fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato generando diacilglicerol e inositol (1,4,5)-trisfosfato (IP_3). El IP_3 generado difunde en el citosol y se une a sus receptores, situados en el retículo endoplásmico, formados por tetrámeros de éstos, que permite la salida del calcio (Ca^{2+}) almacenado en el organelo. Tanto el diacilglicerol, como el Ca^{2+} favorecen la activación de la proteína cinasa C (PKC). La activación de la PKC tiene diferentes efectos sobre la célula generando diversas respuestas celulares que incluyen la contracción, la secreción y la activación metabólica dependiendo del tipo celular. Este es el mecanismo más empleado por los receptores α_1 -adrenérgicos ver Figura 1.

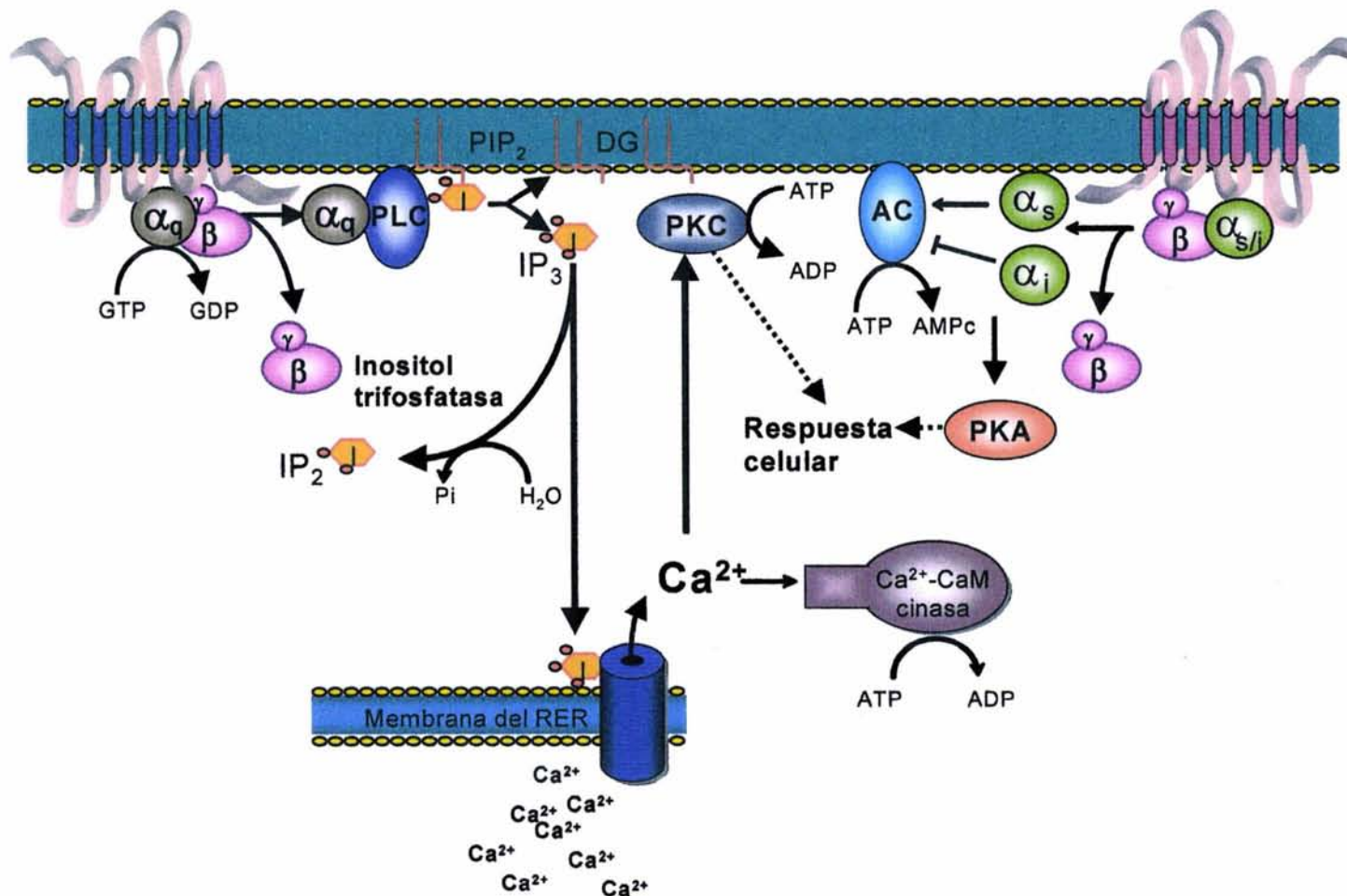


Figura 1. Vías de Transducción de los Receptores Adrenérgicos. A, agonista; R- α_1 , receptor α_1 -adrenérgico; R- α_2 , receptor α_2 -adrenérgico; R- β , receptor β -adrenérgico; AC, adenilato ciclasa; PLC β , fosfolipasa C-; PKC, proteína cinasa C; PKA, proteína cinasa A; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP₃, inositol 1,4,5-trisfosfato; DAG, diacilglicerol.

Las proteínas G heterotriméricas median una gran variedad de señales intracelulares debido a que son intermediarias en el acoplamiento de receptores de siete dominios transmembranales con diferentes moléculas efectoras por lo que ahora es claro que los receptores α_1 -adrenérgicos no sólo interaccionan con la proteína G_q , sino que también se acoplan a la proteína G_i , (Casas-González et al., 2000).

La eficacia con la cual los receptores adrenérgicos propagan las señales extracelulares es regulada dinámicamente debido a la existencia de mecanismos de control, que por un lado le permiten a la célula responder rápidamente al agonista y por el otro la protegen de las variaciones sostenidas o extremas en el ambiente externo.

Desensibilización

La estimulación prolongada de los receptores acoplados a proteínas G regulan la acción de sus agonistas cuando estos se presentan de manera repetida o persistente. En esta situación la respuesta al estímulo hormonal es disminuida, o incluso ausente. A este proceso se le ha denominado como desensibilización (Lohse et al., 1993). La desensibilización rápida, que se produce seguida de un estímulo hormonal agudo, está mediada por la fosforilación del receptor. Esta fosforilación es llevada a cabo por diferentes tipos de cinasas que probablemente actúan de forma secuencial como las activadas por las proteínas G llamadas GRKs (por sus siglas en inglés, G proteins Receptors Kinases) y aquellas activadas por segundos mensajeros (PKC activada por el diacilglicerol y para algunas isoformas también por el calcio y PKA activada por el aumento intracelular en el AMP cíclico). La desensibilización se ha dividido en dos tipos: desensibilización homóloga y desensibilización heteróloga.

Desensibilización Homóloga

La desensibilización homóloga es un fenómeno general, en donde la acción de hormonas y neurotransmisores es el mecanismo regulador común de la función de diversos receptores. Se caracteriza por una pérdida rápida y específica en la capacidad de activación de los receptores cuando han sido estimulados de manera repetida por el agonista o cuando el agonista estimula de forma intermitente al receptor, mientras que la respuesta de otros receptores permanece inalterada (Benovic, et al., 1998). En la familia de receptores acoplados a proteínas G, este proceso ha sido estudiado en la rodopsina que es el receptor

que media la fototransducción en células de la retina y en el receptor β_2 -adrenérgico en el que su activación, inducida por las catecolaminas, lleva a la estimulación de la adenilato ciclasa. La PKA activada por el AMP cíclico es capaz de fosforilar y desensibilizar al receptor β_2 -adrenérgico cuando éste ha sido estimulado o bien cuando aumenta el AMP cíclico intracelular en respuesta a otros estímulos. Por otra parte, los receptores antes mencionados también son fosforilados por cinasas específicas que sólo actúan sobre los receptores acoplados a proteínas G, por lo que se les conoce como GRKs. Estas cinasas tienen la característica de fosforilar exclusivamente a los receptores que han sido activados por su ligando y en los que muy probablemente los sitios de fosforilación quedan accesibles como parte de un cambio conformacional (Premont et al., 1995).

Los receptores al ser fosforilados aumentan su afinidad por las proteínas β -arrestinas; la β -arrestina, al unirse al complejo receptor-proteína G, evita que interactúe con las proteínas G, por lo que se mantiene el estado desacoplado del receptor, ver Figura 2. La fosforilación del receptor por las GRKs es un paso importante en el proceso de desensibilización e internalización de los GPCR. Los receptores fosforilados son desfosforilados por fosfatasas que se encuentran localizadas en los endosomas intracelulares, los cuales son los encargados del tráfico de los receptores después de su estimulación y desensibilización (Krueger et al., 1997; Pitcher et al., 1995).

En la desensibilización homóloga intervienen 3 procesos importantes: 1) el desacoplamiento rápido (segundos) del receptor de la proteína G, sin que exista una disminución del número de receptores; 2) la internalización de los receptores, que se produce a los pocos minutos de la estimulación por el agonista, a continuación los receptores son introducidos en las vesículas intracelulares, en las cuales permanecen por lo que son inaccesibles al agonista; 3) la “down regulation” se da después de una estimulación prolongada por el agonista (horas) ocasionando una disminución en el número total de receptores debido a un aumento en la degradación o a una disminución en la síntesis de los mismos (Lohse et al., 1990).

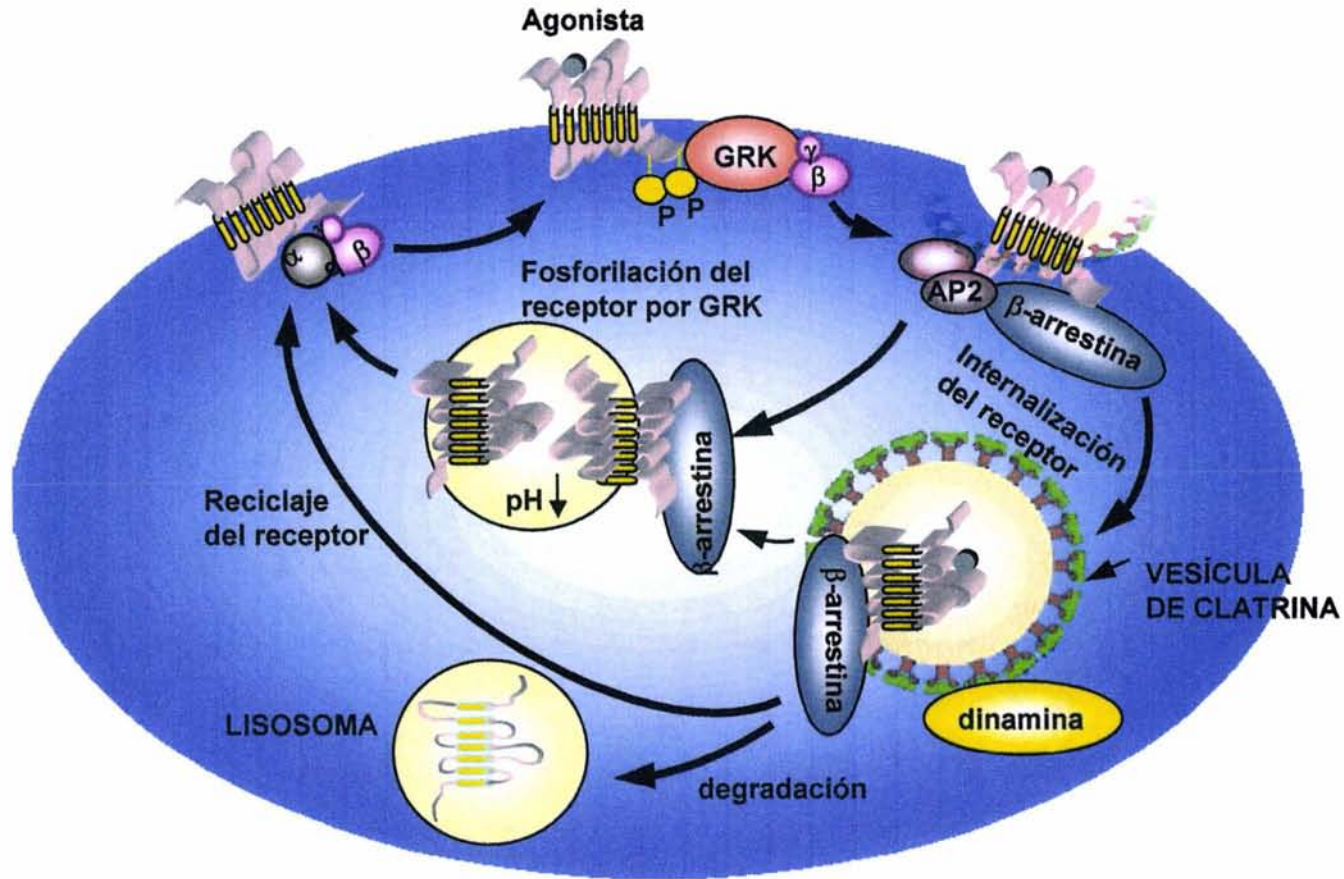


Figura 2. Modelo de la desensibilización homóloga. La activación de los receptores acoplados a proteínas G por el agonista lleva a la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$, que conforman a la proteína G. El dímero libre $\beta\gamma$ recluta a las proteínas cinasas específicas para los receptores acoplados a las proteínas G (GRKs), las cuales fosforilan a los receptores ocupados por su agonista. La fosforilación del receptor por las GRKs es una señal para que las β -arrestinas se unan al receptor, este complejo receptor fosforilado- β -arrestina, será recubierto por la proteína clatrina, formando una hendidura en la membrana, junto con las proteína dinamina, la cual cierra el cuello de la hendidura formándose la vesícula en la cual los receptores se internalizan. EL receptor fosforilado junto con la β -arrestina es internalizado dentro de los endosoma. El pH ácido del medio interno del endosoma favorece la desfosforilación del receptor, el cual regresa a la superficie de la membrana celular, reciclándose ó para seguir un proceso de degradación. (Tomado de Pierce et al; 2002).

Regulación por GRKs

Las enzimas GRKs pertenecen a una familia de al menos seis proteínas cinasas de serina/treonina, que fosforilan a los receptores acoplados a proteínas G sólo cuando el agonista se encuentra unido al receptor. El mecanismo propuesto para explicar estas interacciones es el siguiente: una vez que el receptor es ocupado por su agonista, se induce un cambio conformacional favoreciéndose la interacción con las proteínas G, lo que produce una disociación del heterotrímero liberando a la subunidad α y al dímero formado por las subunidades $\beta\gamma$. El dímero unido a la membrana en forma de un complejo, $\beta\gamma$ -fosfatidilinositol-bisfosfato, se une al dominio carboxilo terminal de la GRK, lo que induce la fosforilación de los receptores (Ferguson et al., 1998). La fosforilación del receptor no es suficiente para que exista el proceso de desensibilización, pero contribuye para generar un sitio de alta afinidad para promover la asociación de las β -arrestinas, lo que garantiza la desensibilización del sistema, ya que la unión de las β -arrestinas no permite que se asocien nuevamente las subunidades α y $\beta\gamma$ de la proteína G (Lohse et al., 1990).

A continuación, el receptor sigue dos caminos: ser reciclado y/o degradado. Este proceso se da por medio de la internalización de los receptores en los endosomas, en los cuales los receptores al ser desfosforilados por fosfatasas específicas (2A) son regresados a la superficie de la membrana reciclándose; o los receptores internalizados son degradados por los lisosomas, ver Figura 3.

Las GRKs en mamíferos están codificadas por una familia de seis genes: la GRK1 conocida como la rodopsina cinasa; la GRK2 o β ARK1 conocida como la cinasa del receptor β -adrenérgico; la GRK3 o β ARK2; las GRK4; GRK5; GRK6 y GRK7. En la Tabla 1 se dan algunas de las características de la familia de las GRKs (Sterne-Marr et al., 1995). Las GRKs antes mencionadas se localizan en el citosol y se mueven hacia la membrana cuando los receptores, que son sus sustratos, se encuentran ocupados por su ligando, es decir en su estado activo. En cambio cuando los receptores no están ocupados, es decir en su estado inactivo, las GRKs se encuentran en el citosol. La forma en que cada una de las distintas GKR interactúan con la membrana es particular para cada una de ellas, de esta manera las GRKs sufren modificaciones postransduccionales que promueven la unión de lípidos, como la farnesilación de la GRK1 y la palmitoilación de la GRK4 y

GRK6 en residuos de cisteínas presentes en la región carboxilo terminal de las GRKs; la GRK5 posee una región con fuerte carga positiva que le permite asociarse con los lípidos de carga negativa, abundantes en la cara citosólica de la membrana. Por su parte las GRKs que inactivas se distribuyen en el citosol, se desplazan a la membrana cuando el receptor es activado y en la membrana interaccionan con el dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G que queda libre cuando éstas son activadas (Pitcher et al., 1995). Este último es un mecanismo interesante, ya que el dímero $\beta\gamma$ se encuentra disponible solamente cuando un receptor es estimulado por su ligando y lleva a la disociación del heterotrímero de las proteínas G (Premont et al., 1995).

Las GRKs que fosforilan a los receptores α_{1B} -adrenérgicos son las GRK 2, 3 y 6. La fosforilación ocurre en los residuos de Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰ de la región carboxilo terminal del receptor (Diviani et al., 1997).

Tabla 1

Características de los miembros de la familia de las GRKs

Nombre de la Familia	Tamaño (kDa)	Variantes Polipeptídicas	Distribución ^a Tejidos	Modificación Covalente	Activadores	Inactivadores
GRK1 (cinasa de la rodopsina)	63	N.D.	Retina (ROS) > pineal	Farnesilación	Policaciones	Recoverina
GRK2 (β ARK1)	79	N.D.	<i>l</i> > <i>cx</i> > <i>co</i> > <i>pl</i> > <i>r</i>	N.D.	<i>G</i> $\beta\gamma$, PIP ₂ , PKC, c-Src	MAPK
GRK3 (β ARK2)	80	N.D.	<i>ol</i> > <i>c</i> > <i>r</i> > <i>co</i> > <i>pl</i> > <i>b</i>	N.D.	<i>G</i> $\beta\gamma$, PIP ₂	N.D.
GRK4	66	Cuatro	<i>t</i> > > > <i>c</i>	Palmitoilación	N.D.	N.D.
GRK5	68	N.D.	<i>co</i> , <i>pl</i> > <i>me</i> > <i>c</i> , <i>h</i> > <i>r</i>	N.D.	Policaciones, PIP ₂	PKC, calmodulina
GRK6	66	Si	<i>C</i> , <i>me</i> >> <i>co</i> , <i>pl</i> , <i>r</i> > <i>h</i>	Palmitoilación	Policaciones	N.D.
GRK7	62	N.D.	Retina (cono)	N.D. (Farnesilación?)	N.D.	N.D.

N.D., no determinado

^a Determinado por la expresión de RNAm: *C*, cerebro; *cx*, corteza cerebral; *co*, corazón; *h*, hígado; *pl*, pulmón; *r*, riñón; *olf*, tracto olfatorio; *l*, leucocitos; *b*, bazo; *me*, músculo esquelético; *t*, testículos. PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; ROS, segmento externo del bastón. (Tomado de Ferguson 2001)

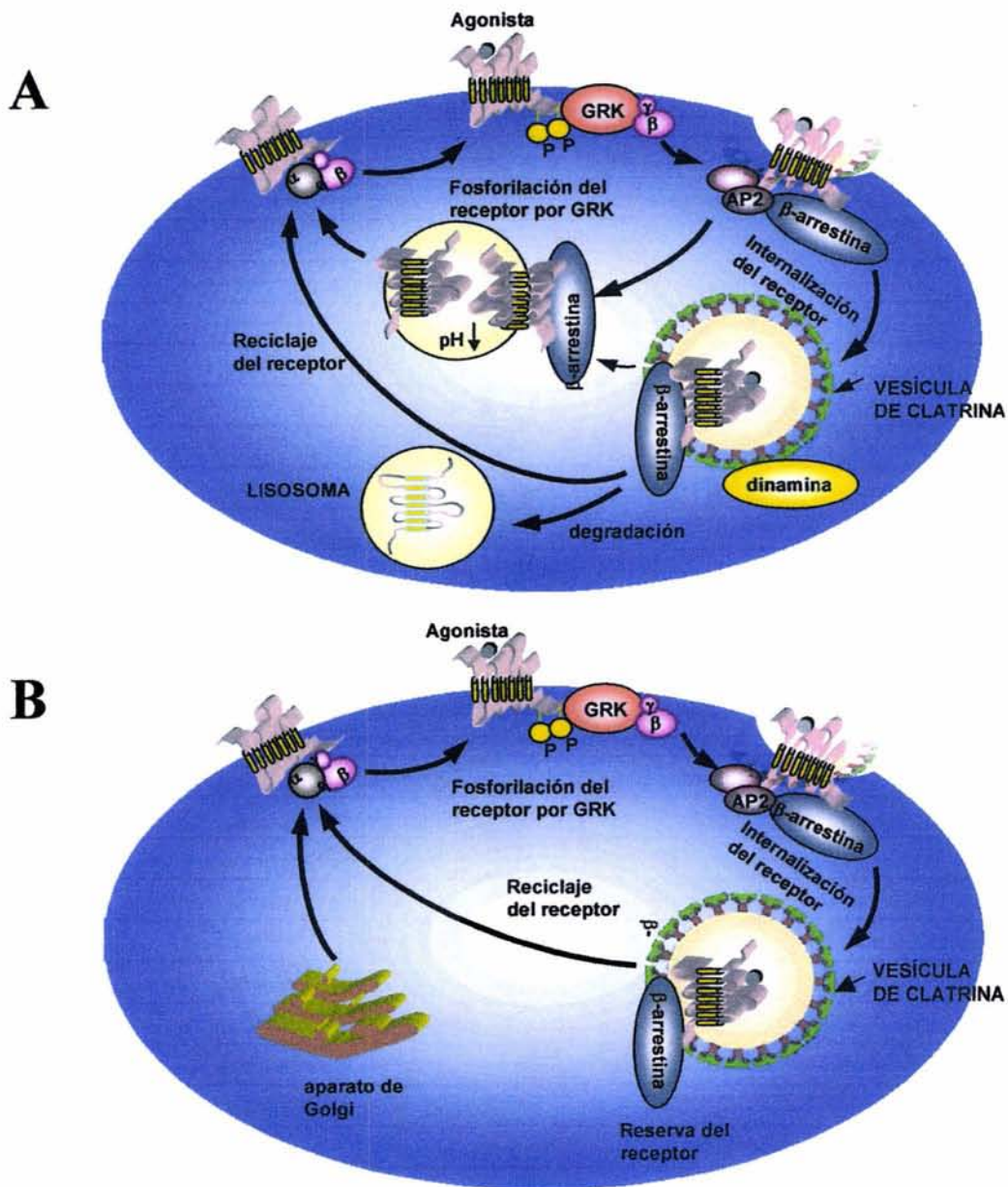


Figura 3. Esquema del posible mecanismo molecular durante el proceso de desensibilización e internalización de los receptores acoplados a proteínas G.

Mecanismo I La activación del receptor lleva a la fosforilación del receptor por el agonista (A) y favorece la fosforilación del receptor por la GRK en residuos de serina y treonina localizados en el receptor en la región intracelular carboxilo terminal, que facilitan la translocación y unión de las β -arrestinas (β Arr) al receptor, asociándose al complejo adaptador AP2 por medio de la subunidad β 2 de la adaptina. Todo este complejo se une a la clatrina para que se forme el endosoma recubierto de clatrina el cual será cerrado por la proteína dinamina. El endosoma formado sigue los siguientes pasos: (1) en el endosoma, las β Arr se separan del receptor; (2) por la disminución del pH se activa la fosfatasa 2A para desfosforilar al receptor y éste puede regresar a la membrana plasmática; (3) el receptor dentro del endosoma es llevado hacia los lisosomas para su degradación por lo que existe una disminución del número de receptores en la membrana plasmática.

Mecanismo II. Los receptores en la membrana son internalizados junto con la β Arr en endosomas donde permanecen como almacén. o los receptores son sintetizados por el Aparato de Golgi cuando son requeridos. (Tomado de Ferguson 2001).

Función de las β -arrestinas en la regulación los GPCRs

Las arrestinas son proteínas que juegan un papel muy importante en el bloqueo de la transducción de señales iniciada por los receptores acoplados a proteínas G. La actividad de estas proteínas en el proceso de desensibilización homóloga sucede inmediatamente después de la fosforilación del receptor. El bloqueo de la señal ocurre por la capacidad que tiene la arrestina de interferir directamente con el acoplamiento del receptor con la proteína G (Lohse et al., 1990). A la fecha se conocen cuatro isoformas distintas de proteínas β -arrestinas en mamíferos. Dos pertenecen al sistema de fototransducción (la arrestina del bastón y la arrestina de cono). Las otras dos isoformas de arrestinas son la arrestina 2 también llamada β -arrestina 1 y la arrestina 3 llamada β -arrestina 2, las cuales son expresadas ubicuamente y se sabe que regulan los procesos de internalización de los receptores de siete dominios transmembranales (Benovic et al., Sterne-Marr et al., 1995), ver Figura 3.

La internalización de los receptores acoplados a proteínas G es un fenómeno observado comúnmente como una respuesta a la estimulación por el agonista. El modelo en donde más se ha estudiado este proceso es en los receptores β_2 -adrenérgicos, estos receptores se expresan naturalmente en los eritrocitos de pavo, en los cuales se llevaron a cabo los ensayos de unión a ligandos radiactivos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos observándose así su distribución diferencial. Los receptores activados no fueron detectados con compuestos hidrofílicos después de 5 minutos, pero sí se detectaron por los compuestos hidrofóbicos, lo que indicó que los receptores eran secuestrados dentro de los compartimientos intracelulares especializados al ser expuestos al agonista. Esto ocurrió dentro de los primeros minutos de exposición y coincide en el tiempo de fosforilación del receptor y la unión a la β -arrestina (Barak et al., 1999), ver Figura 3.

Uno de los primeros reportes en la literatura en el que se demuestra este fenómeno en tiempo real es el de la activación del receptor de neuroquina 1 en las células HEK 293. Haciendo diferentes construcciones con la proteína verde fluorescente (GFP) y la PKC, las GRKs y la β -arrestina 2, se observó una redistribución de la GFP-PKC a la membrana plasmática como respuesta a la estimulación por la sustancia P, mostrando que los receptores para la neuroquina 1 son activados dentro de los primeros segundos de la exposición al

agonista y que la respuesta se pierde a los 30 segundos. La desensibilización del receptor coincide con la redistribución de la GFP-GRK2 del citoplasma a la membrana plasmática, seguida de una translocación de la GFP- β -arrestina (Barak et al., 1999). A la fecha existen numerosos reportes sobre el secuestro de los receptores durante la desensibilización y la resensibilización. Algunas evidencias sugieren que este fenómeno es parte del proceso de desensibilización, mientras que otras evidencias sugieren que la internalización es un paso por el cual los receptores son resensibilizados y reciclados a la membrana (Yu et al., 1993), ver Figura 3.

Estudios realizados con los receptores β_2 -adrenérgicos han demostrado que la dinamina, una proteína 100 kDa con actividad de GTPasa, es la encargada de cerrar el cuello de la vesícula que se forma para internalizar a los receptores la cual se recubre de una proteína llamada clatrina. Esta proteína es esencial para el “secuestro” de los receptores β_2 -adrenérgicos durante el proceso de endocitosis (Zhang et al., 1996). La sobreexpresión de las β -arrestinas produce un aumento en el proceso de internalización de un 50% en los receptores de angiotensina II (AT_{1A}) (Zhang et al., 1996). La sobreexpresión de la mutante negativa de la dinamina (K44A) bloquea la internalización de los receptores β_2 -adrenérgicos en las células HEK 293, pero no tiene efecto sobre la endocitosis de los receptores para la angiotensina II (AT_{1A}) (Zhang et al., 1996). La movilización de los receptores se lleva a cabo por un camino dependiente de la dinamina, como se demostró con la co-expresión de la mutante negativa (K44A) la cual bloqueó el proceso de endocitosis. Los receptores β_2 -adrenérgicos y la β -arrestina fueron colocalizados junto con la clatrina en las vesículas revestidas de clatrina (Goodman et al., 1996). La idea de que la unión de las β -arrestinas a los receptores acoplados a proteínas G favorece el proceso de endocitosis vía la formación de vesículas recubiertas de clatrina ha sido comprobada por los estudios en donde se demuestra que la β -arrestina se une directamente a los componentes de la maquinaria del proceso de endocitosis, ver Figura 3. Las β -arrestinas se unen tanto a la cadena pesada de la clatrina como a la proteína adaptina, la cual es una subunidad del adaptador heterotetramérico AP-2 (Goodman et al., 1997). Este complejo adaptador está formado por dos subunidades grandes: α adaptina y β_2 adaptina (100 kDa para ambas), una subunidad mediana μ_2 (50 kDa) y una subunidad pequeña σ_2 (17 kDa) (Kirchhausen et al., 1999). Cada subunidad del complejo cumple con una función distinta. La subunidad α

adaptina se une a la clatrina, la dinamina y al Eps 15. La subunidad β_2 adaptina es esencial para la formación de la cubierta de clatrina, interactuando tanto con la clatrina como con los motivos de leucina. La subunidad mediana $\mu 2$ reconoce la secuencia señal, NPXY para la internalización (Kirchhausen et al., 1999).

Varias rutas han sido descritas para el proceso de internalización: 1) la internalización dependiente de arrestina, dinamina y clatrina como por ejemplo en el caso del receptor β_2 -adrenérgico; 2) la internalización dependiente de dinamina e independiente de arrestina, por ejemplo en los receptores para acetilcolina M1 y M4; 3) la internalización independiente de dinamina y arrestina, por ejemplo en el receptor de la acetilcolina M2 y el receptor de angiotensina AT₁; 4) la internalización dependiente de las caveolas, como por ejemplo en la familia de receptores β -adrenérgicos y en la familia de los receptores muscarínicos.

La mayor parte de los estudios sobre el proceso de desensibilización homóloga se han desarrollado en el receptor β -adrenérgico, en particular el β_2 . En cambio para los receptores α_1 -adrenérgicos existe mucha menos información, aunque del receptor α_{1B} -adrenérgico es del que se tiene un poco más de información.

Regulación del receptor α_{1B} -adrenérgico

Las primeras evidencias reportadas sobre la desensibilización rápida producida por la estimulación de los receptores α_{1B} -adrenérgicos por su agonista norepinefrina, se obtuvieron en células DDT₁MF2 de músculo liso de vasos eferentes de hámster, en donde se asocia el proceso de desensibilización con la fosforilación y desacoplamiento de los receptores α_{1B} -adrenérgicos. En estas mismas células también se observó que el agonista induce una disminución del número de receptores en la superficie de la célula, sugiriéndose un proceso de internalización de los receptores (Leeb-Lundberg et al., 1987). En fibroblastos Rat-1 se expresaron los receptores α_{1B} -adrenérgicos de hámster por transfección estable y se demostró un aumento en el estado de fosforilación del receptor al estimularse con la norepinefrina (Diviani et al., 1996; Vázquez-Prado et al., 1997). Al truncarse la región carboxilo terminal del receptor α_{1B} -adrenérgico se impide el proceso de fosforilación y de desensibilización inducida por el agonista. Lo que apoya la idea de que el

carboxilo terminal de los receptores es importante para regular su función al ser activados por su agonista. (Lattion et al., 1994; Vázquez-Prado et al., 2000). Además se observó que el aumento en la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico no se afecta por el empleo de inhibidores de la PKC (Lattion et al., 1994). Estos mismos autores reportaron los sitios de fosforilación del receptor en los residuos de las Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰ de la región carboxilo terminal y que dicha fosforilación es catalizada por la GRK2 (Diviani et al., 1997). En el caso de la fosforilación inducida por la activación directa de la PKC por el éster de forbol (PMA), ésta se lleva a cabo sobre los residuos Ser³⁹⁴ y Ser⁴⁰⁰ (Diviani,., 1997). Así, la mayoría de las evidencias indican claramente que cuando los receptores α_{1B} -adrenérgicos son activados por sus agonistas son entonces sustrato de las GRKs, produciéndose una fosforilación del receptor asociada con el proceso de desensibilización e internalización del receptor, como se describió anteriormente.

Desensibilización Heteróloga

La capacidad del receptor para responder a la estimulación por su agonista es a veces disminuida por la activación de un receptor no relacionado mediante un mecanismo llamado desensibilización heteróloga. Este proceso frecuentemente resulta de la fosforilación de uno de los receptores por proteínas cinasas, tales como la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC), que son activadas por el otro receptor. Sin embargo, puede ser también el resultado de la fosforilación y desensibilización de la proteína G o de la utilización de otros componentes comunes del sistema de transducción, por ejemplo enzimas como la PKC y la PKA (Chuang et al., 1996; Ferguson et al., 1996).

Las proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros reconocen sitios de fosforilación consenso en cualquier receptor acoplado a las proteínas G. La activación de estas cinasas (PKA y PKC) no sólo conlleva la fosforilación de los receptores activados por sus agonistas, sino que además, promueven la fosforilación de otros receptores, lo que se le denomina, *cross-talk* o regulación cruzada.

Regulación por la proteína cinasa A

En la literatura existen varios ejemplos de este tipo de desensibilización heteróloga, sobre todo para el receptor β -adrenérgico, en particular el β_2 . El aumento en la

concentración de AMPc ejerce, a través de la PKA, efectos reguladores a diferentes niveles de la cascada de señales. Por ejemplo, la activación de la adenilato ciclasa puede conducir a una disminución en el número de receptores que activan el recambio de fosfoinosítidos, tal es el caso. del estudio realizado en células CHO (células de ovario de hámster) cotransfectadas con los receptores β_2 -adrenérgicos y con los receptores muscarínicos M1 (los β_2 interaccionan con la proteína Gs y estimulan a la adenilato ciclasa y a los M1 estimulan el recambio de fosfoinosítidos), en el que la estimulación prolongada de los β_2 -adrenérgicos resulta en una disminución en el número de receptores muscarínicos. Este efecto también se generó por la activación directa de la adenilato ciclasa por la forskolina (Lee et al., 1993). Sin embargo, en otras células, la estimulación crónica en la producción de AMPc mejora la respuesta del recambio de fosfoinosítidos como se observa al estimular a los receptores para la bradicinina en células MC3T3-E1, en las que además se detecta un aumento en el número de receptores para esta hormona (Banno et al., 1993). La activación de la PKA fosforila y desensibiliza a diferentes tipos de receptores como los receptores: β_2 -adrenérgicos (Benovic et al., 1985; Clark et al., 1988), a los receptores AT₁ para angiotensina II (García-Caballero et al., 2001) y al receptor α de los tromboxanos (Yamamoto et al., 2002).

Regulación por la proteína cinasa C

La activación de la PKC disminuye la actividad de la vía de recambio de fosfoinosítidos activada por diferentes receptores acoplados a proteínas G. Los blancos potenciales de la PKC incluyen el receptor, la G_q y la PLC entre otros (García-Sáinz, 1991). La PKC forma parte de un mecanismo de regulación negativo ya que en diversos reportes se ha demostrado su participación en el proceso de fosforilación/desensibilización de los receptores, por citar algunos ejemplos de este proceso; la activación de la PKC que induce la fosforilación de los receptores AT₁ y AT_{II} para la angiotensina II (García-Caballero et al., 2001; Olivares-Reyes et al., 2000), de los receptores δ de los opiodes (Xiang et al., 2001), así como, de los receptores α_{1a} -adrenérgicos (Vázquez-Prado et al., 2000), α_{1b} -adrenérgicos (García-Sáinz et al., 1999) y α_{1d} -adrenérgicos (García-Sáinz et al., 2000) en todos ellos hay una disminución de la respuesta a su ligando.

Regulación cruzada entre los receptores α_{1b} -adrenérgicos y otros receptores acoplados a proteínas G

En el caso de los receptores α_1 -adrenérgicos la información es más escasa, probablemente porque se han realizado pocos estudios acerca de los mecanismos que participan en el proceso de desensibilización y porque se acoplan a una ruta de señalización diferente (recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+}) activando a otras vías de transducción: como la de la fosfolipasa A_2 (PLA₂) y a la fosfolipasa D (PLD) específica de la fosfatidilcolina (Minnenam 1988).

Las primeras evidencias que se tienen del proceso de desensibilización de los receptores α_{1B} -adrenérgicos son las que obtuvieron con hepatocitos aislados de rata. En este caso la activación de la PKC por ésteres de forbol (PMA) bloqueó las acciones de los receptores α_{1b} -adrenérgicos y este efecto estuvo asociado a la fosforilación del receptor (Corvera et al., 1984; Corvera, et al., 1986). La fosforilación inducida por el éster de forbol también se observó en células DDT-1 MF2, en las que se demostró la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico (Leeb-Lunberg et al., 1985). Otro ejemplo de regulación cruzada, se obtuvo en estudios *in vitro* en los que demostró que los receptores α_{1B} -adrenérgicos, purificados de células DDT-1 MF2, una línea celular de músculo liso de vasos eferentes de hámster, son fosforilados por la activación de la PKA (Bouvier et al., 1987), aunque no se ha encontrado cuál pueda ser su importancia fisiológica *in vivo*. Existen diferentes reportes que apoyan el papel de la PKC en la desensibilización de los receptores α_1 -adrenérgicos y la activación directa de la enzima con ésteres de forbol (TPA), ya que se ha observado que disminuyen las respuestas α_1 -adrenérgicas en varios sistemas.

En células DDT₁-MT2, al ser estimuladas con la bradicinina, existe una fosforilación y desensibilización de los receptores α_{1B} -adrenérgicos, de forma similar a lo que se produce por el tratamiento con ésteres de forbol (Leeb-Lundberg et al., 1987).

En los hepatocitos de las especies que expresan naturalmente a los 3 subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos se ha observado que tienen diferente sensibilidad a los efectos reguladores de la PKC (García-Sáinz y Macías-Silva, 1996).

En fibroblastos Rat-1, en donde se expresan de forma independiente los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos por transfección estable, se logró determinar la diferente sensibilidad que tienen los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos al efecto bloqueador del TPA. Se observó que el subtipo α_{1d} -adrenérgico es el más sensible, el subtipo α_{1b} -adrenérgico tiene una sensibilidad intermedia y el subtipo α_{1a} -adrenérgico es el menos sensible al efecto bloqueador del TPA (Vázquez-Prado et al., 1996). Estas variaciones en la desensibilización mediada por la PKC se deben muy probablemente a las diferencias estructurales entre los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en la segunda y tercera asas intracelulares y en el carboxilo terminal del receptor, las cuales son regiones en las que se encuentran los sitios posibles de fosforilación por la PKC. La proporción de sitios de fosforilación varía de acuerdo al subtipo de receptor α_1 -adrenérgico del que se trate; por ejemplo, el α_{1D} presenta seis, el α_{1B} presenta cuatro y el α_A presenta tres secuencias consenso para la PKC (García-Sáinz et al., 2000). Sin embargo no parece existir una correlación entre el número de sitios consenso y el nivel de fosforilación del receptor *in vitro*, ya que en condiciones experimentales similares, el que presenta un nivel de fosforilación mayor es el receptor α_{1b} -adrenérgico y el que se fosforila menos es el receptor α_{1a} -adrenérgico (García-Sáinz et al., 2000).

Otro ejemplo es la activación de los receptores para la endotelina los cuales inducen la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico por una activación secuencial de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3-K) y la PKC, lo que produce una desensibilización de la respuesta α_1 -adrenérgica (Vazquez-Prado et al., 1997) probablemente por la utilización de moléculas comunes a las vías de transducción (Chuang et al., 1996; Ferguson et al., 1996) que a su vez activan a las cinasas activadas por segundos mensajeros (PKA y PKC) suministrando una vía de retroalimentación negativa, para regular la sensibilidad del receptor por el cual fueron activadas y de esta forma pueden participar en la desensibilización homóloga. Además, estas enzimas también pueden modular a los receptores no ocupados por el agonista y contribuir de manera importante en la desensibilización heteróloga (Lohse et al., 1993).

La Proteína cinasa C (PKC)

La proteína cinasa C representa una familia de al menos 12 proteínas con actividad de cinasa sobre residuos de serina/treonina. Las isoformas de la PKC participan, como ya se mencionó anteriormente, en las cascadas de transducción activadas por la acción hormonal, neuronal y por factores de crecimiento. En las células de mamífero las isoformas de la PKC están codificadas por 10 genes, las isoformas β I y β II son el resultado del procesamiento alternativo de dichos genes. De acuerdo a su estructura y a su regulación por cofactores las PKCs se clasifican en tres grupos: (1) las PKCs convencionales (cPKC): α , β I, β II y γ son dependientes de Ca^{2+} y activadas por la fosfatidilserina (PS) y el segundo mensajero DAG, además son blanco de los ésteres de forbol (TPA), que son compuestos diterpénicos con una estructura muy similar a la del DAG que se intercalan en la membrana activando fácilmente a la PKC; (2) las PKCs nuevas (nPKC): δ , ϵ , η y θ son independientes de Ca^{2+} y reguladas por PS y DAG y son también activadas por TPA y (3) las PKCs atípicas (aPKC): ι , λ y ζ son independientes de Ca^{2+} y no requieren del DAG para su activación, aunque la PS regula su actividad y no responden a la activación por los ésteres de forbol, ver Tabla 2 (Hofmann et al., 1997; Mellor et al., 1998).

Las isoformas de la PKC están distribuidas ampliamente en los tejidos de mamíferos, aunque algunas isoformas se encuentran en tejidos específicos, como por ejemplo la PKC θ que está presente en músculo esquelético y en las células hematopoyéticas; la PKC γ que está restringida al sistema nervioso central y la PKC β que está presente en las células de los islotes pancreáticos, los monocitos, el cerebro y tejidos de la retina, ver Tabla 2 (Kanashiro et al., 1998).

Estructuralmente, las diferentes isoformas de la PKC están formadas por una sola cadena polipeptídica, construida por dos dominios que están unidos por una región hipervariable (región bisagra): el dominio regulador formado por la región amino-terminal y el dominio catalítico que comprende el carboxilo terminal; cada uno de estos dominios tiene regiones altamente conservadas así como regiones variables. En la literatura existen diversas evidencias de la participación de la PKC en la regulación de los receptores $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgicos (Alcántara-Hernández et al., 2001).

Tabla 2

ISOFORMAS DE LA PKC EXPRESADAS EN TEJIDOS DE MAMIFEROS			
PKC	SUBESPECIES	ACTIVADORES	EXPRESION
Convencionales (cPKC)	α βI βII γ	Ca ²⁺ , DAG, PS, FFA, LysoPC	Amplia Ciertos Tejidos Diferentes Tejidos Cerebro
Nuevas (nPKC)	δ ε η(L)	DAG, PS, DAG, PS, FFA, PIP ₃ DAG, PIP ₃ , PS, SULFATO DE COLESTEROL	Amplia Cerebro y otros Tejidos Piel, Pulmón, Corazón
Atípicas (aPKC)	θ μ ζ λ(i)	PS, ? PS, ? PS, FFA, PIP ₃ ? PS, ?	Músculo, Células T, etc. Células NRK Amplia Diferentes Tejidos

DAG: Diacilglicerol; PS: Fosfatidilserina; FFA: Ac. Grasos cis-Insaturados; LysoPC: Lisofosfatidilcolina; PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5, trisfosfato.

Tomada de Rendón-Huerta et al., 2001

En nuestro laboratorio, empleando hepatocitos de rata que expresan estos receptores hemos tratado a las células con los ésteres de forbol (TPA) para activar de forma directa a la PKC y hemos observado que la respuesta α_{1B} -adrenérgica se bloquea (Corvera et al., 1984; García-Sáinz et al., 1985). Este efecto fue también comprobado en células DDT₁-MF2 donde se demostró la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por los ésteres de forbol. La capacidad de los ésteres de forbol para activar de forma directa a la PKC ha sido estudiada en las células Rat-1 en las cuales se han expresado a los receptores α_{1b} -adrenérgicos de hámster (Diviani et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 1997).

Los estudios de la estructura de los receptores α_1 -adrenérgicos han permitido determinar que el carboxilo terminal del receptor tiene los sitios consenso para la fosforilación por la PKC, tal fosforilación ocasiona la desensibilización del receptor α_{1B} -adrenérgico (Lattion et al., 1994). En estudios en el receptor α_{1b} -adrenérgico humano expresado en fibroblastos de ratón se determinó que el receptor α_{1b} -adrenérgico es fosforilado por la acción del TPA (García-Sáinz et al., 1996).

Estudios realizados en diferentes sistemas de transducción de señales han señalado a la familia de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3-K), como un grupo de enzimas importantes que pueden ser reguladas por diferentes estímulos en respuesta a factores de crecimiento y a citocinas. En los años recientes se han reportado a los lípidos fosforilados por estas enzimas en la posición 3-OH, como moléculas importantes que actúan como segundos mensajeros y que pueden de manera directa o indirecta regular la actividad de diferentes proteínas cinasas con actividad sobre residuos de serinas/treoninas, incluyendo a isoformas de la PKC, la cinasa p70 S6 y la PKB/Akt (Duronio et al., 1998).

La Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI3-K)

Algunas rutas de señalización convergen y son reguladas por la enzima fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3-K, por su nombre en inglés *Phosphoinositide 3-kinase*). La PI3-K cataliza la reacción de fosforilación del -OH en la posición 3' del anillo de inositol del lípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y es uno de los mediadores de diferentes señalizaciones. Los lípidos fosforilados son producidos en la membrana celular como resultado de la activación de diferentes señales de transducción y estos lípidos fosforilados ayudan a reclutar y a activar a varios componentes de las vías de señalización. La activación de la PI3-K produce la fosforilación del lípido de membrana fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato [PI(4,5)P₂] a fosfatidilinositol-3-4-5-trisfosfato [PI(3,4,5)P₃]; por lo tanto, esta enzima fosforila en la posición 3 del anillo de inositol, en respuesta a la estimulación de la célula por un grupo de hormonas y factores de crecimiento que permiten el inicio del ciclo celular, la migración y la sobrevivencia. La señal de la PI3-K finaliza con la degradación del [PI(3,4,5)P₃] por al menos dos tipos diferentes de fosfatasas: las fosfatasas que tienen homología con Src 2 y las fosfatasas PTEN. Los lípidos producidos por la PI3-K no son sustratos para la enzima PLC. Existen múltiples isoformas de las PI3-K, que pueden ser divididas en tres clases con base a su estructura y su especificidad por el sustrato (Vanhaesebroeck et al., 1997; Fruman et al., 1998; Wymann et al., 1998).

Clase I de la fosfatidil inositol 3-cinasa

La clase I de las PI3-Ks son heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica de ~110 kDa (p110) y una subunidad adaptadora/reguladora de 85 kDa (p85). Estas PI3-Ks, *in vitro*, pueden utilizar como sustrato al fosfatidilinositol [PI], al fosfatidilinositol 4-fosfato [PI(4)P] y al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PI(4,5)P₂]. En las células, sin embargo, parecen preferir al [PI(4,5)P₂], lo que da por resultado el fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato [PI(3,4,5)P₃]. La clase I de las PI3-Ks se subdivide en dos subclases de enzimas, la I_A y la I_B, que intervienen en la transducción de la señal cascada abajo de los receptores con actividad de cinasa de tirosina y de los receptores acoplados a proteínas G,

respectivamente. La clase I de las PI3-K se unen a las proteínas G monoméricas como Ras, pero aún no es muy claro el papel de dichas interacciones.

Clase I_A de la fosfatidilinositol 3-cinasa

Los mamíferos presentan tres isoformas de la subunidad catalítica (p110 α , p110 β y p110 δ , codificadas por tres genes diferentes) y al menos siete proteínas reguladoras. Las subunidades p110 α y p110 β están ampliamente distribuidas en los tejidos de los mamíferos, mientras que la distribución de la p110 δ es más restringida y se encuentra solamente en los leucocitos (Vanhaesebroeck et al., 1997).

La subunidad reguladora, llamada generalmente proteína p85, de la que han sido purificadas y clonadas dos isoformas la p85 α y la p85 β , no tiene actividad enzimática y estructuralmente está compuesta de varios dominios homólogos a otras proteínas implicadas en la transducción de señales; tanto la p85 α como la p85 β tienen una región N-terminal, que presenta un dominio con homología con src 3 (SH3); dos o tres segmentos ricos en prolinas; una región que presenta homología con las proteínas con actividad de GTPasa de la familia rho de las proteínas G pequeñas y dos dominios con homología con src2 (SH2), cuya función es interactuar con la región catalítica N-terminal de la subunidad p110 (Fruman et al., 1998). Varios grupos han reportado que algunos ligandos que activan a las proteínas G, estimulan la actividad de las PI3-K clase I_A, lo cual podría explicarse por la inducción de la actividad de cinasas de tirosina vía proteínas G. (Rameh et al., 1999). Por otra parte, parece ser que la p110 β , pero no la p110 α o la p110 δ , puede ser activada directamente por el complejo $\beta\gamma$ *in vitro* (Vanhaesebroeck et al., 1997).

Clase I_B de la fosfatidilinositol 3-cinasa

La única PI3-K de la clase I_B identificada a la fecha es la formada por el heterodímero de la subunidad catalítica p110 γ con la subunidad reguladora de ~101 kDa (p101) de la cual no se ha encontrado una proteína con una secuencia homóloga. El heterodímero p110/p101 es activado por el complejo formado por las subunidades $\beta\gamma$ del heterotrímero de las proteínas G y la p101 es indispensable para la respuesta (Krugmann et al., 1999). Algunos reportes muestran que la clase I_B de las PI3-K es la responsable de la

activación de la subunidad G_{α} (Stoyanov et al., 1995; Murga et al., 1998). Esta clase PI3-K I_B se encuentra al parecer únicamente en mamíferos, con un patrón de distribución muy restringido (sólo se encuentra en los leucocitos). Esto podría explicar por qué los receptores activados por proteínas G no inducen la activación de la PI3-K en todos los tipos celulares. Sin embargo, la generación del $[PI(3,4)P_2]/[PI(3,4,5)P_3]$ vía la clase I_B es menos usada que la vía de la clase I_A . La clase I_B emplea como sustratos *in vitro*: $[PI]$, $[PI(4)P]$ y $[PI(4,5)P_2]$, pero *in vivo* sólo al $[PI(4,5)P_2]$.

Clase II de la fosfatidilinositol 3-cinasa

La clase II de las PI3-K está formada por proteínas de ~170-210 kDa, que tienen una característica distintiva ya que contienen un dominio C2 en su C-terminal (Tabla 3). Este dominio C2 puede unir fosfolípidos de forma independiente de Ca^{2+} *in vitro* debido a que les falta un residuo crítico (aspártico), presente sólo en los dominios que unen lípidos de manera dependiente de Ca^{2+} . Estas proteínas tienen también un dominio denominado PIK y un dominio catalítico, él que presenta una similitud de 45-50% con el de la clase I de las PI3-K.

Los genes de las cinasas clase II han sido clonados de humano y de ratón, así como de *D. melanogaster*, *D. discoideum* y *C. elegans* cuya región C-terminal tienen homología con los dominios C2. Otras proteínas con dominios C2 son algunas isoformas de la PKC. Una característica de algunas de las enzimas clase II de las PI3-K ($PI3K-2\alpha$ y β) es que pueden utilizar Ca^{2+} /ATP para su actividad de cinasa *in vitro*.

La clase II de las PI3-Ks utilizan como sustratos *in vitro*: al $[PI]$, al $[PI(4)P]$ y al $[PI(4,5)P_2]$, pero *in vivo* no es muy claro qué lípidos utilizan. La clase II de las PI3-Ks es activada por la insulina, el factor de crecimiento epidérmico, el factor derivado de plaquetas, las integrinas y las quimocinas. Los mecanismos mediante los cuales se da tal activación no han sido esclarecidos. A diferencia de la clase I de las PI3-Ks que se mantienen en el citosol, la clase II de las PI3-K se encuentran asociadas a la membrana de las células predominantemente. Los mamíferos tienen tres isoformas de la clase II ($PI3KC2\alpha$, β y γ) las cuales son producidas por genes distintos. Las isoformas $PI3KC2\alpha$ y $PI3KC2\beta$ tienen una distribución ubicua, en cambio la $PI3KC2\gamma$ sólo se encuentra en el hígado.

Clase III de la fosfatidilinositol 3-cinasa

La clase III de las PI3-Ks son proteínas homólogas a la proteína de levadura vesicular Vp34p y utilizan únicamente al [PI] como sustrato tanto *in vivo* como *in vitro*. Ellas son las responsables de la generación del [PI(3)P]. El nivel de este lípido al parecer permanece constante en las células. Esta clase está formada por una sola subunidad catalítica identificada en todas las células eucariontes, tanto en las levaduras como en los mamíferos; esta subunidad se encuentra formando un complejo con una proteína cinasa con actividad de Ser/Thr (Vps15p en levadura y p150 en mamíferos). En la Tabla 3 se resumen las características de las diferentes clases de la fosfatidilinositol 3-cinasa.

Inhibidores de la PI3-K

Con el descubrimiento de inhibidores de la actividad de la PI3-K fue posible describir la función de la PI3-K en varios sistemas de señalización. La wortmanina es un inhibidor potente y selectivo, generado por un hongo como un metabolito, este compuesto modifica irreversiblemente el dominio catalítico de la PI3-K e inactiva a la enzima (Arcaro et al., 1993; Yano et al., 1993). La wortmanina inhibe a la PI3-K dentro del orden nanomolar. Otro inhibidor sintético también muy empleado para bloquear los efectos de la actividad de la enzima es el LY-294002, aunque es menos potente que la wortmanina para bloquear el efecto de la activación de la enzima (Vlahos et al., 1994).

Como la mayoría de los inhibidores, la wortmanina tiene efectos inespecíficos, que pueden causar problemas para interpretar los resultados. Por ejemplo, fue reportado que en varios tipos celulares la wortmanina bloqueaba parcialmente la activación de la cinasa activada por mitógenos (MAPK) inducida por diferentes maneras de estimulación, lo que sugería una participación de la PI3-K para activar a la MAPK en la señal dependiente de *ras* y p21 (Welsh et al., 1994; Cross et al., 1994; Sakanaka et al 1994)

Tabla 3

PI3K de Mamíferos						
		Subunidades		Regulación	Substratos lipídicos	
		catalíticas	adaptadoras		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
I	A	p110 α , β , δ	p85 α P85 β P55 γ	Cinasas de tirosinas y Ras	Fosfato de inositol	Fosfato de inositol-4,5- bifosfato
	B	p110 γ	p101	Proteínas G heterotriméricas y Ras	Fosfato de inositol-4- fosfato Fosfato de inositol-4,5- bifosfato	
II		PI3K-C2 α , β , δ	?	Cinasas de tirosinas? Proteínas G heterotriméricas y Ras? no Ras	Fosfato de inositol Fosfato de inositol-4- fosfato Fosfato de inositol-4,5- bifosfato	?
III		Análogos Vps34p	p150	Constitutiva?	Fosfato de inositol	Fosfato de inositol

● Dominio de unión ◆ Dominio de unión a Ras ○ C2 □ PIK ● Dominio Principal de cinasa

Clases de PI3Ks. Características de las subunidades catalíticas de heterodímero que forman las subunidades. (Tomado de Cantley et al., 2001)

El empleo de los dos inhibidores que bloquean la actividad de la PI3-K, así como el análisis cuidadoso de las concentraciones que se emplean para construir las curvas de concentración efecto inhibitor son de gran ayuda para relacionar su efecto bloqueador sobre algún evento celular de interés. Con la ayuda de estos inhibidores los estudios de la participación de la PI3-K se han incrementado y han mostrado que la PI3-K es activada en respuesta a la mayoría, pero no a todos los factores de crecimiento y además, toma parte en la regulación de numerosas vías de señalización. Por ejemplo, las proteínas señal con dominios homólogos a plekstrina (PH), son activadas por la interacción directa al [PI(3,4,5)P₃], como las Akt cinasas con actividad de serina-treonina (también llamadas proteínas cinasas B) y las cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1). La asociación con el [PI(3,4,5)P₃] en la membrana ocasiona que la Akt esté más próxima a la PKD1, lo que facilita la fosforilación de la Akt por la PKD1 (Lawlor et al., 2001). La PKC ζ es activada por el [PI(3,4,5)P₃]. En estudios realizados *in vitro* se vió que el [PI(3,4,5)P₃] es capaz de activar a varias isoformas de la PKC, tales como las isoformas atípicas δ , ϵ , η , y ζ e incluyendo a la forma convencional, PKC α . En una línea celular hemapoyética humana, la PI3-K es capaz de asociarse con la PCK δ y PKC ϵ , así como en plaquetas (Nakanishi et al., 1993).

La Familia del TGF- β

El factor de crecimiento transformante β “TGF- β ” (por sus siglas del inglés Transforming Growth Factor β) son péptidos involucrados en el control de importantes funciones como la proliferación, la diferenciación, la migración celular, la reparación de tejidos, el desarrollo embrionario, la respuesta inmune y la muerte celular entre otros (Massagué et al., 2000; ten Dijke et al., 2002).

El TGF- β forma parte de una gran familia de péptidos extracelulares que se encuentran relacionados estructuralmente, en la familia se incluyen a los TGF- β s, a las activinas, a las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y a los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) entre otros. Sus homólogos han sido identificados en *Drosophila melanogaster* (*dpp*, *Gbb/60^a*, *srew*, y *dActivin*) y en *Caenorhabditis elegans* (*daf-7*, *dbl-1* *unc-129* y *tig-2*). Los integrantes de la superfamilia comparten, además de las

características estructurales, los mecanismos de síntesis y de señalización (Zimmerman et al., 2000).

En un principio el TGF- β fue identificado y nombrado con base en las observaciones en las que el TFG- β estimulaba la proliferación celular en los fibroblastos en cultivo. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que estas moléculas son en su mayoría potentes inhibidores del crecimiento y de la división celular en varios tipos celulares. La familia del TGF- β es ahora conocida ampliamente como una familia de proteínas que inhiben el crecimiento; las moléculas que componen cada uno de los pasos de la vía de señalización han sido identificadas como supresoras de tumores (Massagué 2000).

Porque la señal del TGF- β ha sido generalmente asociada a un efecto negativo sobre el crecimiento celular y por que la inactivación de esta señal contribuye a la generación de tumores. Se ha observado que las mutaciones tanto, en la familia de receptores para TGF- β como en las proteínas Smad resultan en tumores, como por ejemplo, en la mayoría de los cánceres gastrointestinales se ha encontrado que el receptor tipo II es inactivo; otro ejemplo muestra que al menos en la mitad de los carcinomas pancreáticos la proteína Smad 4 se encuentra mutada (Shi et al., 2003). Muchos otros desórdenes somáticos o hereditarios son el resultado de mutaciones o un mal funcionamiento de la señal del TGF- β por lo que las alteraciones en las moléculas que conforman la cascada de señalización del TGF- β han sido implicadas en varias enfermedades humanas, tales como: los desórdenes vasculares, las enfermedades auto-inmunes y el cáncer (Bloobe et al. , 2000).

El primer miembro de la familia del TGF- β se descubrió hace aproximadamente 20 años. A la fecha se han descrito tres isoformas del TGF- β expresadas en los mamíferos, que son: el TGF- β 1, el TGF- β 2 y el TGF- β 3. Estas isoformas están codificadas en tres cromosomas diferentes (en el humano en los cromosomas: 19q13, 1q41 y 14q24 respectivamente). La isoforma TGF- β 4 se expresa en el pollo y la isoforma del TGF- β 5 se encuentra en *Xenopus*. La secuencia de aminoácidos de los TGF- β se encuentra muy conservada entre las especies (de un 97% entre varias especies de aves y mamíferos) (Massagué 1990; Kingsley et al., 1994)

Todas las isoformas del TGF- β se sintetizan como precursores diméricos que se secretan al medio extracelular como moléculas inactivas, de las cuales se originan los

TGF- β s maduros que son activos. Cada cadena del dímero es sintetizada como un precursor de 390 a 412 aminoácidos que se une a diversas proteínas de membrana con alta afinidad.

Los 112 residuos localizados en el extremo carboxilo terminal constituyen la forma madura del TGF- β , la cual contiene nueve cisteínas; mientras que, los residuos restantes localizados en la porción amino terminal forman el péptido asociado a la latencia LAP (TGF- β Latency Associated Protein). Este precursor tiene las características de un polipéptido secretor, contiene un péptido señal que permite su translocación a través del retículo endoplásmico y está glicosilado (Massagé, 1998).

El proceso proteolítico del pro-TGF- β está mediado por endopeptidasas como la furina (Dubois et al., (1995). El sitio de corte del precursor son cuatro aminoácidos básicos precedidos inmediatamente del dominio con actividad biológica. La región amino de la LAP no se requiere para la actividad biológica del TGF- β , pero juega un papel importante en mediar el correcto plegamiento y dimerización de las regiones maduras. Las dos cadenas de polipéptidos del pro-TGF- β unidas mediante un puente disulfuro permanecen unidas al dímero LAP por interacciones no covalentes. A este complejo se le llama TGF- β latente pequeño. El complejo TGF- β latente grande se refiere a un complejo que además contiene a una de las cuatro proteínas de unión al TGF- β latente (LTBPs, proteínas de unión al TGF- β latente), mediante uniones covalentes al LAP, ver Figura 4. Las LTBPs tienen un papel central en el procesamiento y la secreción de los TGF- β s. Las proteínas LTBPs pertenecen a la familia de las LTBPS/fibrilinas, las cuales son proteínas de la matriz extracelular, ver Figura 4.

Los TGF- β s son producidos por la mayoría de las células en forma de complejos latentes que no son capaces de asociarse con los receptores del TGF- β y transmitir la señal. Las mutaciones en el dominio LAP producen una retención intracelular del TGF- β , lo que demuestra que la asociación del TGF- β con el LAP es un requerimiento esencial para la secreción del TGF- β (Roberts, 1998). Los complejos latentes están asociados a la matriz extracelular en las líneas celulares en cultivo.

La activación del complejo TGF- β latente *in vivo* se lleva a cabo por una gran variedad de moléculas, desde protones hasta proteasas. La activación proteolítica del TGF- β latente es producto de la actividad de enzimas como la plasmina, las MMP-2/9, estas proteínas pertenecen a la familia de proteasas de serina y metaloproteasas respectivamente

(Annes, et al., 2003). Además la activación *in vivo* también implica la participación de una proteína de matriz extracelular llamada trombospondina-1, el mecanismo involucra la unión del LAP por medio de la secuencia LSKL localizada cerca de la región amino terminal, con la secuencia KRFK de la trombospondina-1 y al parecer esta interacción trombospondina-1-precursor latente produce un arreglo conformacional del LAP que permite la activación del TGF- β (Murphy-Ullrich et al., 2000).

La activación del TGF- β latente se lleva a cabo *in vitro* por calentamiento a 85°C por 10 min por una disminución del pH (1.5) por detergentes o por la acción de enzimas proteolíticas como la furina o la plasmina (Annes et al., 2003).

Todas las isoformas del TGF- β ejercen su acción biológica a través de la formación de complejos específicos con los receptores tipo II y I que tienen actividad de cinasa sobre residuos de serina y treonina.

Existen otras dos glicoproteínas que atraviesan la membrana, el receptor tipo III ó β -glicano y la endoglina, que ayudan al control de la interacción del TGF- β con sus receptores.

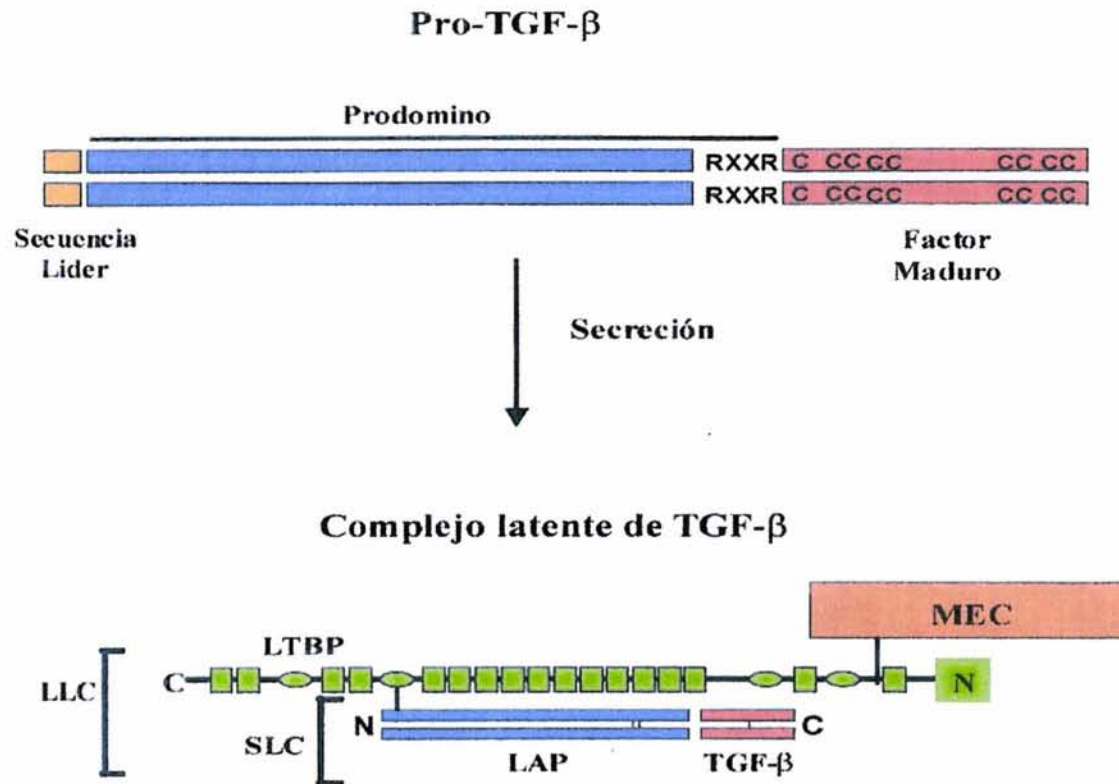


Figura 4. Precursor y forma latente del TGF- β . El TGF- β es secretado como un precursor formado por una secuencia líder N-terminal, un prodominio y un dominio activo, factor maduro, que contiene nueve cisteínas (C). En la secuencia RXXR se encuentra el sitio de corte para dejar libre al factor maduro. Al ser cortado el prodominio (LAP) permanece asociado con el dímero del TGF- β , por uniones no covalentes, formando un complejo latente denominado complejo latente pequeño (SLC). Este complejo se une a la proteína LTBP a través de puentes disulfuro, formando el complejo latente grande (LLC). El LLC se une a la matriz extracelular (MEC). (Tomado y modificado de Koli et al., 2001)

Los receptores para el TGF- β

Los receptores pertenecen a la familia de receptores con actividad de serina/treonina. Actualmente se han detectado doce miembros de estos receptores en el genoma humano: siete para el receptor tipo I y cinco para el tipo II (Manning et al., 2002).

Los receptores tipo I y II son proteínas transmembranales, formadas por alrededor de 500 aminoácidos, ambos tipos de receptores tienen actividad de proteína cinasa sobre residuos de serina/treonina y participan directamente en la transducción de la señal del TGF- β , mientras que los receptores tipo III ayudan a la interacción del ligando con el receptor tipo II. El receptor II es una cinasa activa constitutivamente y su interacción con su ligando favorece la formación del complejo heteromérico con el receptor I. El receptor I requiere del receptor II para unirse al TGF- β . Por otro lado, el receptor II puede unirse de forma independiente al TGF- β pero requiere de la presencia del receptor I para la transducción de la señal. El TGF- β se une directamente al receptor II. El TGF- β unido al receptor II es reconocido por el receptor I, formando un complejo heterotetramérico. El receptor I es entonces fosforilado por el receptor II en los residuos de serinas y treoninas de la secuencia TTSGSGSG del dominio GS (Wrana et al., 1994) que conlleva a la fosforilación y activación de la cinasa del receptor I, la cual tiene como sustratos a las proteínas Smad, que son el equivalente a los segundos mensajeros en la vía de transducción de la señal del TGF- β , ver Figura 6. Las proteínas Smad fueron descubiertas a través de estudios genéticos en *D. melanogaster* y *C. elegans* (Attisano et al., 2000). El nombre de Smad se originó de la fusión de Mad y Sma, proteínas de *D. melanogaster* y *C. elegans*, respectivamente (Derynck et al., 1996).

Las proteínas Smads

Las proteínas Smads están formadas por cadenas de polipéptidos de alrededor de 400 a 500 aminoácidos de longitud, y su secuencia se encuentra muy conservada entre ellas, así como entre las especies, con una similitud particularmente alta en los dominios N-terminal MH 1 y el C-terminal MH 2 y una similitud variable en la región de unión "linker" (Heldin et al., 1997; Massagué 1998).

Las Smads son divididas funcionalmente en tres distintas subfamilias: Smad regulada por receptor, R-Smad; Smad comunes, Co-Smad y Smad inhibitorias, I-Smad.

La activación de la señal del TGF- β comienza por la unión de una citocina específica a un par de receptores transmembranales, produciéndose una activación por fosforilación en los dominios citoplásmicos de los receptores con actividad de proteína cinasa en residuos de serina/treonina, ver Figura 5 (Wrana et al., 2000), entonces los receptores tipo I fosforilan a las R Smad.

La subfamilia de las R-Smads puede ser dividida en dos grupos: las BMP-Smads y TGF- β /activina-Smad. Mientras que las Smads 1, 5 y 8 son fosforiladas por los receptores tipo I activados por las BMPs; las Smads 2 y Smads 3 son activadas por el TGF- β y la activina.

Las Co-Smads pueden formar complejos heteroméricos con todas las R-Smad activadas por fosforilación y son entonces componentes compartidos en el mecanismo de transducción de la señal del TGF- β , de las activinas y de las BMPs. La única Co-Smad aislada en mamíferos es la Smad 4. En *Xenopus* se han identificado dos Co-Smads; la Smad 4 α y la Smad 4 β (también llamada Smad 10) (Howell et al., 1999; LeSueur et al., 1999; Masuyama et al., 1999).

Las I-Smads inhiben la señal de la familia del TGF- β , evitando la activación de las R-Smad y Co-Smad (Hayashi et al., 1997). Las I-Smads descritas a la fecha son dos, la Smad 6 y la Smad 7 también denominadas anti-Smads, ver Figura 6.

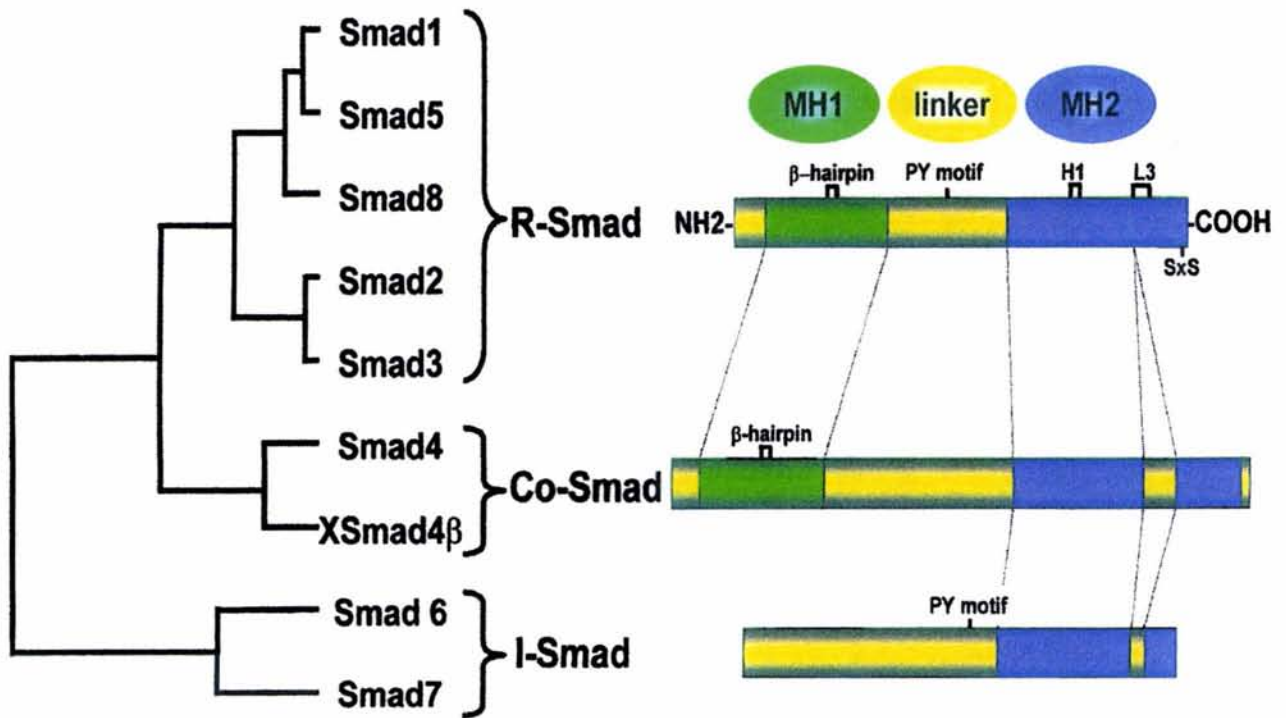


Figura 5. Familia de las proteínas Smads. El árbol filogenético de las proteínas Smads en vertebrados. El esquema muestra la similitud en la secuencia de las tres subfamilias de las proteínas Smads. Las R-Smads (Smads activadas por el receptor) y las C-Smads (Smads comunes) tienen dominios conservados en la región amino terminal (MH1) y en la región carboxilo terminal (MH2) y una región que los separa llamada región de unión. Las I-Smads (Smads inhibitorias) también llamadas anti-Smads. En la región MH2 se encuentra el sitio de fosforilación de las R-Smads en la secuencia SXS. Los motivos PY (región rica en prolinas; el asa L3 en las R-Smads que es importante para la interacción con el receptor tipo I; La horquilla β y la Hélice 1 son importantes para la interacción con el DNA o con las proteínas (Tomado de Itoh et al., 2000)

La activación por fosforilación de la Smad 2 o la Smad 3, permite que formen complejos estables con la Smad 4, estos complejos son capaces de llevar la señal del TGF- β al núcleo celular y con ello regular las respuestas transcripcionales positivas o negativas del TGF- β . La capacidad del complejo formado por las Smads para activar el proceso de transcripción, resulta también de su capacidad funcional para interactuar con otros factores transcripcionales, así como la interacción directa con otras secuencias promotoras. Estos dos requerimientos para la interacción con el DNA y los otros factores de transcripción, son los que le proporcionan la selectividad hacia los diferentes blancos de la transducción de

señal promovida por las Smads, ver Figura 6. El mecanismo de finalización de la señal del TGF- β implica la ubiquitinización de las Smads en el núcleo. La ubiquitina ligasa regula los niveles basales de la Smad 1 (Zhu et al., 1999), mientras que la Smad 2 en el núcleo es blanco de ubiquitinización y por lo tanto de degradación por medio de la formación de proteosomas terminando su función (Lo y Massague, 1999).

Regulación cruzada entre el sistema de señalización del TGF- β y otras vías de señalización.

Además de la inhibición producida por la asociación de la Smad 7 al receptor I de forma tal que evita la fosforilación de otras Smads, otras vías también pueden regular la vía de señalización del TGF- β , por lo que otras cinasas pueden fosforilar a las Smads. Las Smads presentan sitios de fosforilación para las MAP cinasas de la familia Erk (Kretschmar et al., 1997), para la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (Wicks et al., 2000) y para la PKC. No es extraña la existencia de dicha regulación a través de diferentes vías de señalización como la de las activinas y la de las BMPs que regulan el desarrollo embrionario y la diferenciación de tejidos, se sabe que estos efectos pueden ser regulados también por otras vías de señalización.

En el ámbito molecular, el sistema de las Smads converge con la vía de señalización de los receptores con actividad cinasa de tirosina en respuesta a los factores de crecimiento, con la consecuente estimulación del sistema de cinasas activadas por mitógenos (MAPK), ya que por ejemplo, la activación de los receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) producen la fosforilación de la Smad 2 mediante la activación de sus receptores con actividad cinasa de tirosina. La Smad 2 puede ser activada también por la vía de las MAPKs cinasas 1 (MAPKK-1), una proteína cinasa de c-Jun activada por estrés en el sistema SAPK/JNK (de Caestecker et al., 2001). Otro ejemplo es la fosforilación de la Smad 1 por la proteína cinasa MAP/Erk, la que inhibe la translocación de la Smad 1 al núcleo, lo que sugiere que la activación de los receptores con actividad cinasa de tirosina inhiben la señal inducida por la BMP (Nakasima et al., 1999).

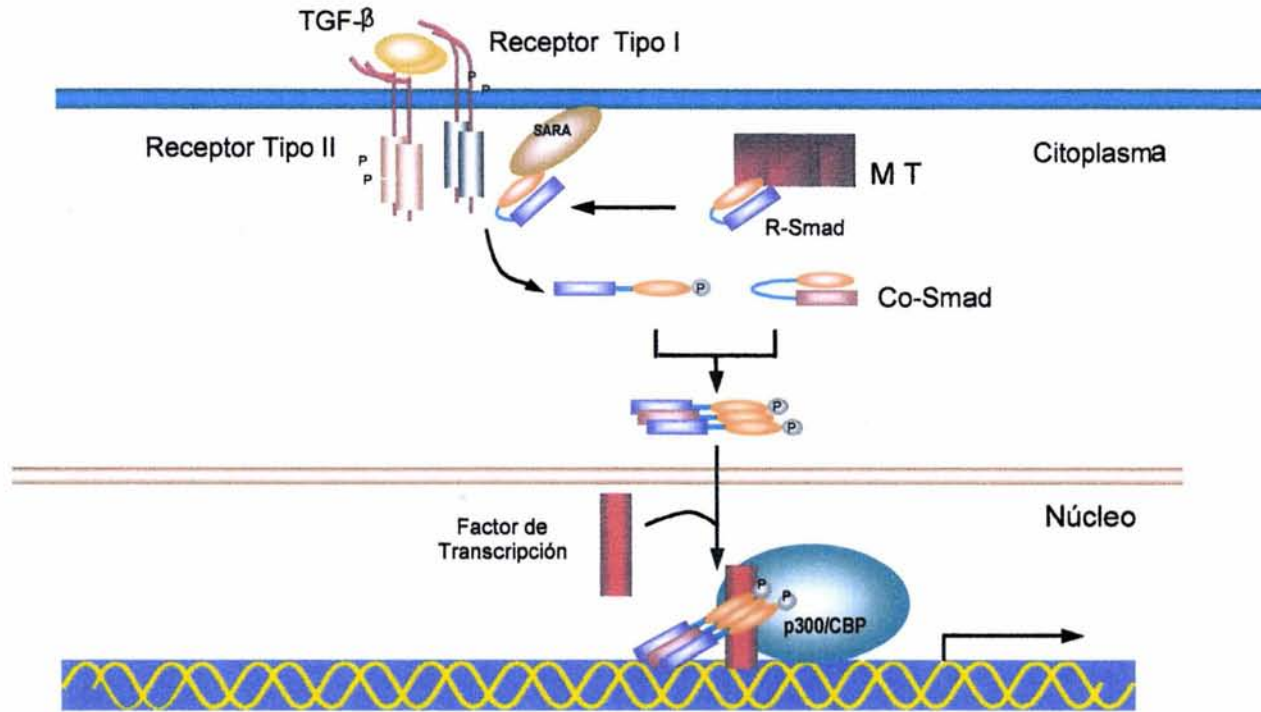


Figura. 6 Esquema del mecanismo de la señal de traducción del TGF- β /Smad. Por la acción de un ligando (TGF- β) se induce la formación de un complejo y la activación de los receptores tipo I y tipo II, las R-Smads son fosforiladas y forman complejos heterodiméricos con las C-Smads, migrando hacia el núcleo donde controlan la expresión de genes blanco en un tipo de célula de manera específica. Las Smads no activadas pueden ser retenidas en el citoplasma por los microtúbulos (MT). La proteína SARA (Smad anchor for receptor activation) ayuda a anclar a la Smad para ser activada por el receptor, es un miembro de las proteínas asociadas a la membrana que contiene dominios FYVE. La modulación transcripcional por las Smads se consigue a través de la formación de los complejos. La fosforilación de las Smads deja libre a la Smad de SARA e induce la formación del complejo de una CoSmad y dos R-Smads. Aunque otra estequiometría no puede ser excluida. (Itoh et al., 2000; Wrana 2000).

Regulación cruzada entre el TGF- β y los receptores acoplados a proteínas G

Los ejemplos anteriores nos muestran una regulación cruzada, *cross-talk*, entre otras vías de señalización con el TGF- β , tales como la vía activada por factores de crecimiento, cuyos receptores con actividad cinasa de tirosina son capaces de regular la señal del TGF- β , a través de las Smads, mientras que el TGF- β afecta a otros sistemas de transducción como el sistema de receptores acoplados a proteínas G, en donde la PKC tiene un papel regulador muy importante en las respuestas celulares, como por ejemplo, la regulación del metabolismo, la secreción y la proliferación celular. La PKC constituye un elemento importante en el sistema de señalización hormonal de los receptores acoplados al sistema de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} ; esta enzima actúa a través de fosforilaciones en residuos de serina y treonina, como un puente bioquímico que comunica a diferentes sistemas de transducción. Algunas de las evidencias de una posible regulación cruzada entre los receptores del TGF- β y los receptores acoplados a proteínas G se proporcionan a continuación: en células de músculo liso de tráquea de humano y en fibroblastos de corazón que expresan a los receptores β -adrenérgicos, el TGF- β disminuye la acumulación del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC), producido por el isoproterenol, un agonista β -adrenérgico, así como también disminuye el número de receptores β -adrenérgicos (Nogami et al., 1994; Iisuka et al., 1995). En estudios en la línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano, se demuestra que el TGF- β activa la expresión de genes de la matriz extracelular (PAI-1) a través de un mecanismo en donde participa la fosfolipasa C de la fosfatidilcolina y la PKC (Halstead et al., 1995; Ignatz et al., 2000). En los fibroblastos Rat-2, el TGF- β induce la activación del elemento de respuesta a suero de *c-fos* (*c-fos* SER), mediante un mecanismo de transactivación en donde participa la PKC (Sung et al., 1999). Más recientemente en los astrocitos de rata, el TGF- β regula los canales rectificadores de K^+ , Kir2.3, a través de la participación de la PLC y de la PKC- δ (Perillan et al., 2002). En las células MvILu la activación directa de la PKC por el PMA induce una fosforilación de la Smad 3, inhibiendo su función como factor de transcripción (Yakymovych et al., 2001). Por otra parte se ha reportado que el PMA induce la activación de Erk para mediar la fosforilación de Smad 3 activando la señal (Biggs et al., 1999).

Además se ha encontrado una gran actividad de la PKC en células de cáncer humano. Como ya se mencionó anteriormente la PKC es un punto muy importante en la regulación de las respuestas celulares por lo que esta enzima constituye un elemento clave en el sistema de señalización del recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} . Así como, en la vía de señalización de los factores de crecimiento, la cual interactúa con la señal de TGF- β . La sobreactivación de los componentes de la vía mitogénica cascada abajo de los receptores con actividad de cinasa de tirosina contribuye a la promoción de la carcinogénesis (Toker, 1998).

Justificación

Los receptores acoplados a proteínas G son regulados eficazmente, mediante modificaciones postraduccionales covalentes, como la fosforilación y la asociación a moléculas reguladoras (GRKs, β -arrestinas), en donde la respuesta a la exposición continua del agonista produce una disminución de la respuesta máxima, lo que se denomina como desensibilización. El proceso de desensibilización ha sido objeto de un intenso estudio en nuestro laboratorio, tanto el proceso mediado por el agonista, como la regulación cruzada *cross-talk* entre otros receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G así como los receptores con actividad de cinasa de tirosina. Algunos de los datos que se han obtenido en nuestro laboratorio sobre esta regulación cruzada y los receptores α_{1b} -adrenérgicos son los siguientes: los receptores para endotelina ET_{1A} , acoplados a $G_{q/11}$, al ser activados son capaces de inducir la fosforilación y la desensibilización de los receptores α_{1b} -adrenérgicos vía la activación de la PKC (Vázquez-Prado et al., 1997); los receptores para el ácido lisofosfatídico (LPA), acoplados a G_i , al ser activados por su ligando, son capaces de inducir la fosforilación y desensibilización de los receptores α_{1b} -adrenérgicos a través de la activación secuencial de la PI3-K y de la PKC (Casas-González et al., 2000). En cambio los receptores para la bradicinina, B_2 , acoplados a $G_{q/11}$, inducen la fosforilación, pero no la desensibilización de los receptores α_{1b} -adrenérgicos (Medina et al., 1998).

En los estudios con factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Factor Derivado de Plaquetas (PDGF), se observó que también

pueden regular la respuesta α_{1b} -adrenérgica. Al activar los receptores para el EGF y el PDGF, se aumenta la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, lo que lleva a una desensibilización del mismo (Medina et al., 2000). El mecanismo propuesto para explicar la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos inducida por el EGF, es a través de la participación secuencial de la PI3-K y de la PKC. En cambio el PDGF utiliza una vía diferente para promover la fosforilación del receptor, en la cual los datos señalan que la PKC es esencial y la PI3-K no contribuye de manera importante (Medina et al., 2000). Otros grupos han demostrado que la activación de los receptores muscarínicos M3 induce la fosforilación y la desensibilización de los receptores α_{1b} -adrenérgicos por la activación de la PKC (Bundey et al., 2001).

Por otra parte, otros investigadores han demostrado que los receptores α_{1b} -adrenérgicos son capaces de modular la respuesta a la interleucina 6, una citocina implicada en las funciones como la respuesta inmune, humoral y neuronal. La activación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos disminuye la acción del factor de transcripción STAT 3, activado por la interleucina 6 (Nguyen et al., 1999).

De tal forma que el interés de esta tesis fue estudiar si la activación de una clase diferente de receptores, los receptores para el TFG- β con actividad de cinasa de serina/treonina como los receptores para el TGF- β , era capaz de regular la respuesta α_{1b} -adrenérgica.

Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos que participan en la regulación heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico, utilizando como modelo a los fibroblastos Rat-1 que por transfección estable expresan a los receptores α_{1b} -adrenérgicos. En particular se quiso estudiar la posible regulación cruzada ejercida por la activación de los receptores endógenos del TGF- β sobre los receptores α_{1b} -adrenérgicos, así como establecer el mecanismo por el cual se lleva a cabo la regulación.

Objetivos Particulares

1.- Investigar en los fibroblastos Rat-1 si la activación de los receptores para TGF- β , que se expresan de forma endógena en este tipo de células, induce un incremento en el estado de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico.

2.- Determinar la participación de las posibles proteínas con actividad de cinasas en el proceso de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, inducido por la activación de los receptores para TGF- β .

3.- Estudiar el papel de la fosforilación en la regulación de la respuesta α_{1b} -adrenérgica, determinando si se presenta un patrón de desensibilización por el efecto de la activación de los receptores para TGF- β .

Hipótesis

Si al activar a los receptores para el TGF- β se induce una fosforilación sobre los receptores α_{1b} -adrenérgicos, entonces es posible que exista una desensibilización de la respuesta α_{1b} -adrenérgica.

Materiales y Métodos

Materiales y reactivos

El medio modificado Dulbecco's Eagle's (DMEM), el antibiótico G418, el suero fetal bovino y otros reactivos para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco BRL. La (-)-norepinefrina, la fentolamina, el TPA, los inhibidores de proteasas y los reactivos de uso general fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. El Ro 31-8220, el LY 294002 y la Bisindolilmaleimida I fueron de Calbiochem. El [³²P]Pi (8500-9120 Ci/mMol); el [2, 3-³H]-mio-inositol (22.9 Ci/mMol) fueron obtenidos de New England Nuclear Life Science Products. La proteína A acoplada a sefarosa se obtuvo de Upstate Biotechnology. El Fura-2/AM fue de Molecular Probes. El péptido del carboxilo terminal del receptor α_{1b} -adrenérgico fue adquirido de Multiple Peptide Systems. Los Kits de purificación del DNA fueron de Qiagen. El cDNA de receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster fue donado gentilmente por el Dr. Robert J. Lefkowitz. El plásmido SR α -p85 que contiene el cDNA de la mutante dominante negativa de la subunidad p85 de la PI3-K, a la cual le falta el sitio de unión a la p110, fue proporcionado amablemente por los Drs. Wataru Ogawa y Masato Kasuga (Hara et al., 1994). El TGF- β 1 fue de RD Systems.

Cultivo celular

La línea celular Rat-1 derivada de los fibroblastos de pulmón de rata que expresan por transfección estable al receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster, además de expresar endógenamente a los receptores para el TGF- β , fueron donados por el grupo del Dr. R. J. Lefkowitz y M. G. Caron (Duke University Medical Center). Las células Rat-1 y las células COS-1 (CRL-1654, ATTC) fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO/BRL) con glutamina, con una concentración de glucosa alta, fue complementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB, GIBCO/BRL) y con los antibióticos estreptomycin, 100 μ g/ml, penicilina, 100 U/ml, anfotericina B, 0.25 μ g/ml y el G418, 300 μ g/ml como antibiótico de selección. Las células COS-1 fueron cultivadas en condiciones similares a las Rat-1, sólo que el medio no contenía el antibiótico de selección,

el G418. Las células fueron cultivadas dentro de una incubadora a 37 °C en una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂.

Para todos los experimentos se emplearon células subconfluentes. Las células fueron ayunadas de suero 24 h antes de los ensayos de fosforilación, de movilización de calcio intracelular (Ca_i²⁺) y de determinación de la producción de fosfatos de inositol (IPs).

Transfección de las células COS-1

Las células COS-1 fueron transfectadas mediante el método de DEAE-Dextran (dietilaminoetil-dextran) (Aruffo et al., 1987; González et al., 1995). Para ello, las células se sembraron en cajas Petri de 10 cm de diámetro y al día siguiente se removió el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con medio DMEM sin suero y se adicionó la mezcla de transfección (10 µg del plásmido, 0.1 mM cloroquina, 0.4 mg/ml DEAE-Dextran). Las células se incubaron 2.5 h a 37 °C en atmósfera de 98% aire y 2% CO₂ (González et al., 1995; Vázquez-Prado et al., 2000). Posteriormente, se les retiró el medio de transfección y se incubaron con solución amortiguadora al 10% de DMSO en PBS (v/v) durante 1 min, inmediatamente se lavaron dos veces más con medio DMEM sin suero, para después agregarles medio DMEM complementado con SFB al 10% (v/v) con antibióticos. Las células COS-1 transfectadas se resembraron al día siguiente en placas de 6 pozos. Las células se utilizaron para los ensayos de fosforilación a las 48 horas después de la transfección. El día del ensayo se les retiró el medio y se les adicionó DMEM sin suero durante 2 h y a continuación se procedió a realizar los ensayos de fosforilación.

Fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico

Las células COS-1 transfectadas y los fibroblastos Rat-1 que expresan el receptor α_{1B} -adrenérgico fueron crecidos en placas de cultivo de 6 pozos a confluencia. El día del experimento las células fueron mantenidas en medio DMEM libre de fosfatos por 1 hora y entonces se incubaron con 2 ml de este mismo medio conteniendo [³²P]Pi (0.30 mCi /ml) durante por 3 horas a 37 °C. Las células marcadas metabólicamente se estimularon con norepinefrina, TGF- β ó TPA de acuerdo al protocolo de cada experimento. Posteriormente se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos-salina (PBS) frío y se resuspendieron en

500 μ l de solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1% (p/v), Tritón 1% (v/v), NaF 50 mM; Na_3VO_4 100 μ M, β -glicerofosfato 10 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, p-serina 1 mM; p-tirosina 1 mM, p-treonina 1 mM; EDTA 5 mM, leupeptina 20 μ g/ml, aprotinina 20 μ g/ml, fluoruro de metil-sulfonilo (PMSF) 100 μ g/ml y de inhibidor de tripsina de soya 50 μ g/ml a pH 7.5 final) por una hora sobre hielo. Los extractos fueron colectados y centrifugados a 10,000 x g durante 15 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Los sobrenadantes de las muestras fueron transferidos a tubos nuevos conteniendo 5 μ l del anticuerpo generado contra el receptor α_{1b} -adrenérgico. Se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente se le adicionaron 20 μ l de proteína A-sefarosa y se continuó la incubación por 2 horas más, terminando la interacción por centrifugación de las muestras. Las esferas de sefarosa fueron lavadas cinco veces por resuspensión-centrifugación con solución amortiguadora de: Hepes 100 mM, NaHPO_4 50 mM, NaF 10 mM, Tritón 10 % (v/v), SDS 0.5 % (p/v) a pH 7.2 (solución amortiguadora de lavado). A las esferas lavadas se les agregó solución amortiguadora de Laemmli (Laemmli, 1970) y fueron hervidas por cinco minutos. Se centrifugaron y los sobrenadantes de las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % (p:v) en condiciones reductoras.

Los geles una vez secados, fueron expuestos sobre una placa del sistema PhosphorImager de Molecular Dynamics con el software Image Quant, para la cuantificación de la fosforilación.

Determinación de la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}]_i^{2+}$

El día del experimento las células se pusieron a cargar con 5 μ M Fura 2/AM en solución amortiguadora de Krebs-Hepes-Glucosa-BSA (NaCl 120 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, KCl 4.75 mM, glucosa 10 mM, Hepes 20 mM, CaCl_2 1.27 mM, albúmina sérica bovina 0.05% (p/v), a pH 7.4) por 1 h a 37 °C con una atmósfera de CO_2/O_2 . Después de este tiempo las células fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos-salina pH 7.4 (PBS). Las células fueron despegadas de la caja Petri con 0.5 ml de solución de tripsina al 0.3% (p/v). La reacción de la tripsina se detuvo con la adición de la solución amortiguadora Krebs-Hepes-glucosa-BSA.

Las células fueron lavadas tres veces más con la solución amortiguadora anterior. Los lavados se realizaron de la siguiente manera: las células fueron centrifugadas a 1200 x g, por 3 min, se retiró el sobrenadante por aspiración y las células se resuspendieron nuevamente con la solución amortiguadora de Krebs-Ringer-Hepes-BSA. A continuación, se realizó la determinación del Ca^{2+} intracelular. En los ensayos con el TGF- β , las células fueron preincubadas con 10 pM del TGF- β durante por 15 min, pasado este tiempo las células fueron estimuladas con las diferentes concentraciones de la norepinefrina. La determinación de la movilización de calcio intracelular en las células en suspensión se determinó por fluorescencia en un equipo Amico-Bowman con agitación y temperatura controladas, ajustando los monocromadores a las longitudes de onda 340 y 380 nm para la excitación y 510 nm para la emisión con un intervalo de adquisición de 0.5 segundos. La concentración de calcio intracelular se calculó de acuerdo a Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985), empleando el software incluido con el equipo. Los trazos mostrados fueron exportados directamente del fluorómetro a las gráficas.

Determinación de fosfatos de inositol totales IP_s.

Las células sembradas en placas de 6 pozos se marcaron metabólicamente con 6 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[2,3\text{-}^3\text{H}]$ -mio-inositol por 18 horas en DMEM libre de inositol. Las células se lavaron con solución amortiguadora de PBS. A continuación se adicionaron 2 ml de solución amortiguadora de Krebs-Ringer-Hepes-LiCl (NaCl 120 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, KCl 4.75 mM, Hepes 20 mM, CaCl_2 1.27 mM, LiCl 20 mM, a pH 7.4) y se dejaron incubando durante 20 min. Las células se estimularon con la norepinefrina o con el TGF- β durante 15 min. La reacción se detuvo por aspiración de la solución amortiguadora anterior en cada pozo, seguida de la adición de 2 ml de la mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v) fría. Las placas se dejaron 30 min sobre una cama de hielo. Los sobrenadantes de cada pozo se transfirieron a tubos de ensayo y se centrifugaron a 1200 x g en una centrífuga clínica, durante 10 min. De la fase acuosa se separaron los fosfatos de inositol marcados con $[^3\text{H}]$ por cromatografía de intercambio iónico en columnas de Dowex AG1-X8.

Resultados

Los resultados que se generaron de este estudio se encuentran publicados en el manuscrito:

α_{1B} -Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor- β

M.Teresa ROMERO-ÁVILA, C.Fabián FLORES-JASSO and J.Adolfo GARCÍA-SÁINZ
Biochemical Journal (2002) 368, 581-587

A continuación se enumeran los resultados del trabajo.

El receptor α_{1b} -adrenérgico fue identificado como una proteína de una sola banda, de ≈ 85 kD, que ha sido identificada previamente con un anticuerpo policlonal generado en conejos utilizando como antígeno a los últimos 10 aminoácidos de la región carboxilo terminal del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster. Este anticuerpo fue capaz de inmunodetectar e inmunoprecipitar al receptor α_{1b} -adrenérgico. En un estudio anterior en nuestro del laboratorio se demostró por fotomarcaje con la [125 I]azido-prazosina, que el anticuerpo generado es específico para el receptor α_{1b} -adrenérgico, ya que células incubadas con fentolamina o prazosina (antagonistas específicos de los receptores α_1 -adrenérgicos) bloquean el fotomarcaje del receptor, (Vázquez-Prado et al., 1996).

El TGF- β induce la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgicos.

Los estudios de fosforilación del receptor mostraron datos muy interesantes. Los fibroblastos Rat-1 que expresan de forma endógena a los receptores para TGF- β y que tienen transfectados los receptores α_{1b} -adrenérgicos de manera permanente, fueron estimulados 15 min con el vehículo (Basal) o con el TGF- β 10 pM a diferentes tiempos, ver Figura 7. La estimulación con el TGF- β indujo la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. La respuesta fue relativamente rápida y transitoria, consiguiéndose el máximo a los 15-30 min de la estimulación y disminuyendo hacia los 60 min. Las células fueron estimuladas durante 15 min con el vehículo ó con diferentes concentraciones del TGF- β (0.01-100 nM), lo que indujo una fosforilación dependiente de la concentración con una EC_{50} de 0.3 pM y consiguiéndose el máximo con 10 pM, ver Figura 7. El aumento en el estado de fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos fue de un 70-80% sobre la fosforilación en condiciones basales, ver Figura 7.

Como la cinética de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el TGF- β es diferente a la que se induce con la norepinefrina, esto nos lleva a suponer que pueda existir la participación de otra(s) cinasa(s) o que sea un mecanismo diferente. Para tratar de obtener mayor información del posible mecanismo por el cual el TGF- β induce la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos se emplearon inhibidores específicos de las proteínas cinasas PKC y PI3-K.

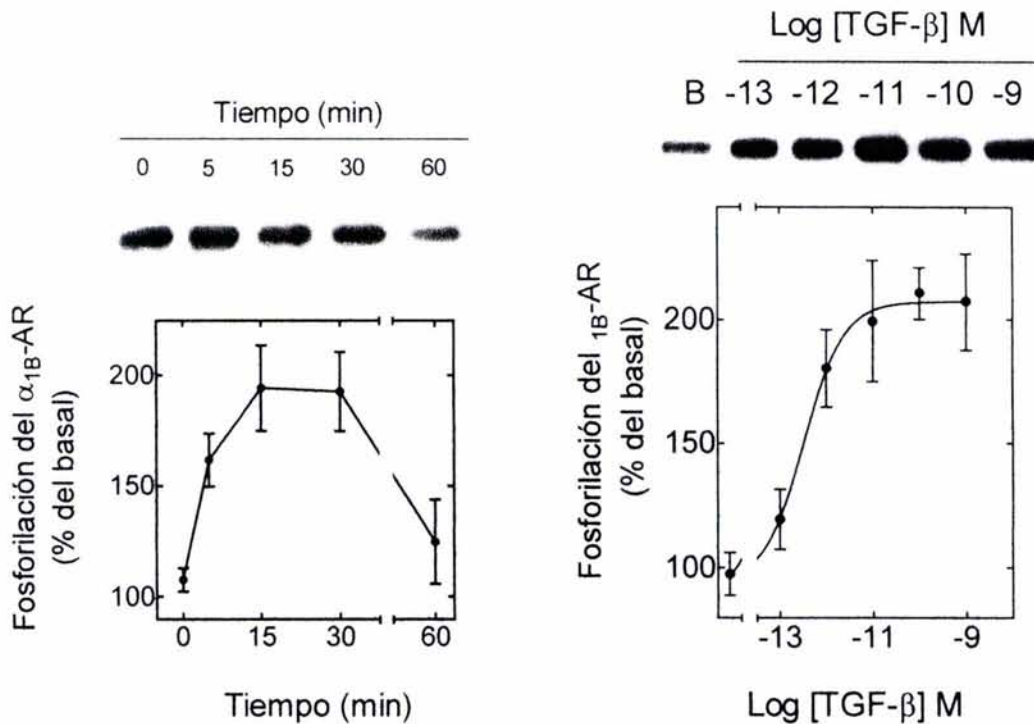


Figura 7. El TGF- β induce la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico. En el *panel izquierdo*. Las células Rat-1 que expresan los receptores para TGF- β y α_{1B} -adrenérgicos fueron marcadas metabólicamente con [32 P]Pi e incubadas en los tiempos que se indican con 10 pM del TGF- β . Panel derecho. Las células fueron incubadas con las concentraciones de TGF- β que se indican en la gráfica durante 15 min. En las gráficas se muestran el promedio y el error estándar de 4-6 experimentos independientes. Se tomó el basal como 100% en cada experimento. Se presenta una auto-radiografía representativa.

Los inhibidores de la PKC y de la PI3-K bloquean la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por el TGF- β .

Para elucidar el mecanismo por medio del cual se lleva a cabo la fosforilación de los receptores α_{1B} -adrenérgicos inducida por 10 pM del TGF- β se emplearon inhibidores específicos de la PKC y PI3-K en concentraciones máximas. Para la PKC se utilizaron: 1 μ M de la bisindolilmaleimida I, 100 nM de la estaurosporina y 1 μ M del RO318220; para la PI3-K se usó 100 nM de la wortmanina. El efecto del TGF- β fue bloqueado por estos inhibidores de estas proteínas cinasas, ver Figura 8.

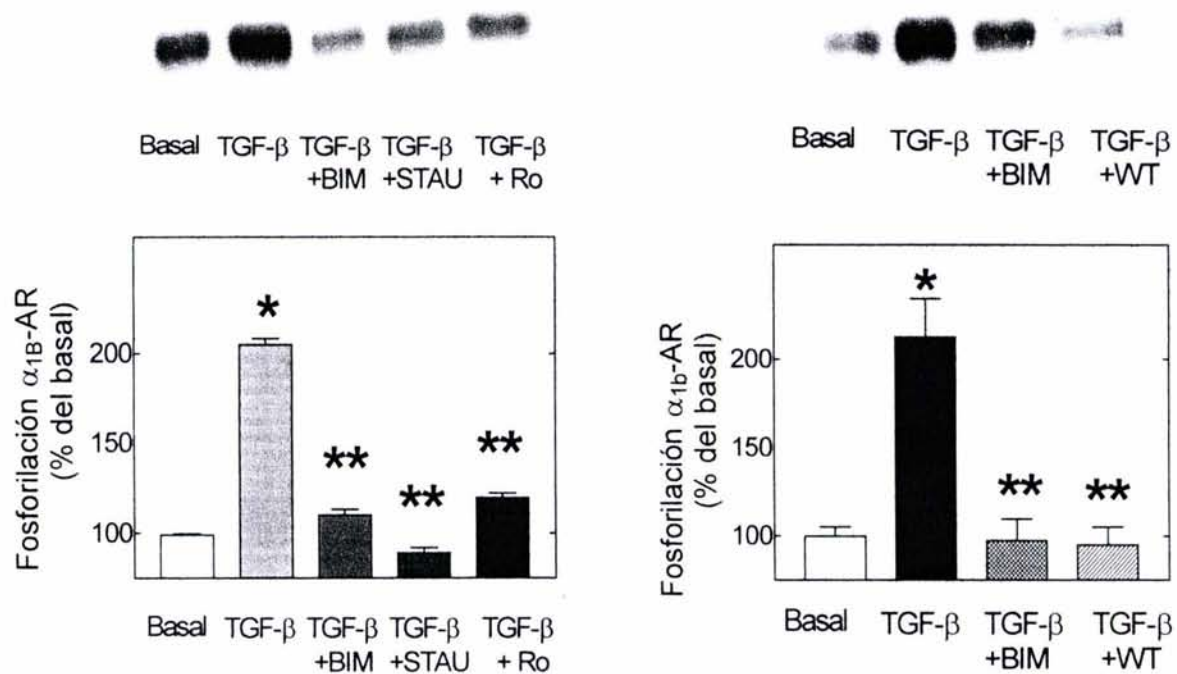


Figura. 8 El efecto de inhibidores de proteínas cinasas sobre la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por la activación de los receptores para TGF- β . En el *panel izquierdo*: las células Rat-1 que expresan los receptores para TGF- β y α_{1b} -adrenérgicos (endógenos y transfectados permanentemente) fueron marcados metabólicamente con [32 P]Pi e incubados con los inhibidores durante 30 min. Sin ningún agente (Basal), con 10 pM del TGF- β solo o 1 μ M de la bisindolilmaleimida (BIM), 100 nM de la estaurosporina (STAU) y 1 μ M del RO318220 (RO) seguida de la estimulación con 10 pM del TGF- β durante 15 min. En el *panel derecho*: las células Rat-1 fueron incubadas sin ningún agente (Basal), con 10 pM del TGF- β solo o incubadas con 1 μ M de la bisindolilmaleimida (BIM) y 100 nM de la wortmanina (WT) durante 30 min, seguida de la estimulación con 10 pM del TGF- β durante 15 min. *P<0.001 comparado con el control; **P<0.001 comparado con el TGF- β . El basal se tomó como 100% en cada experimento. Se presenta una auto-radiografía representativa. En la gráfica se muestra el promedio y el error estándar de 5-6 experimentos independientes.

La fosforilación inducida sobre los receptores α_{1b} -adrenérgicos por la activación de los receptores para el TGF- β se bloquea de manera dependiente de la concentración de los inhibidores de estas dos cinasas sin que se vea efecto sobre la fosforilación basal del receptor, como se observa en la Figura 9.

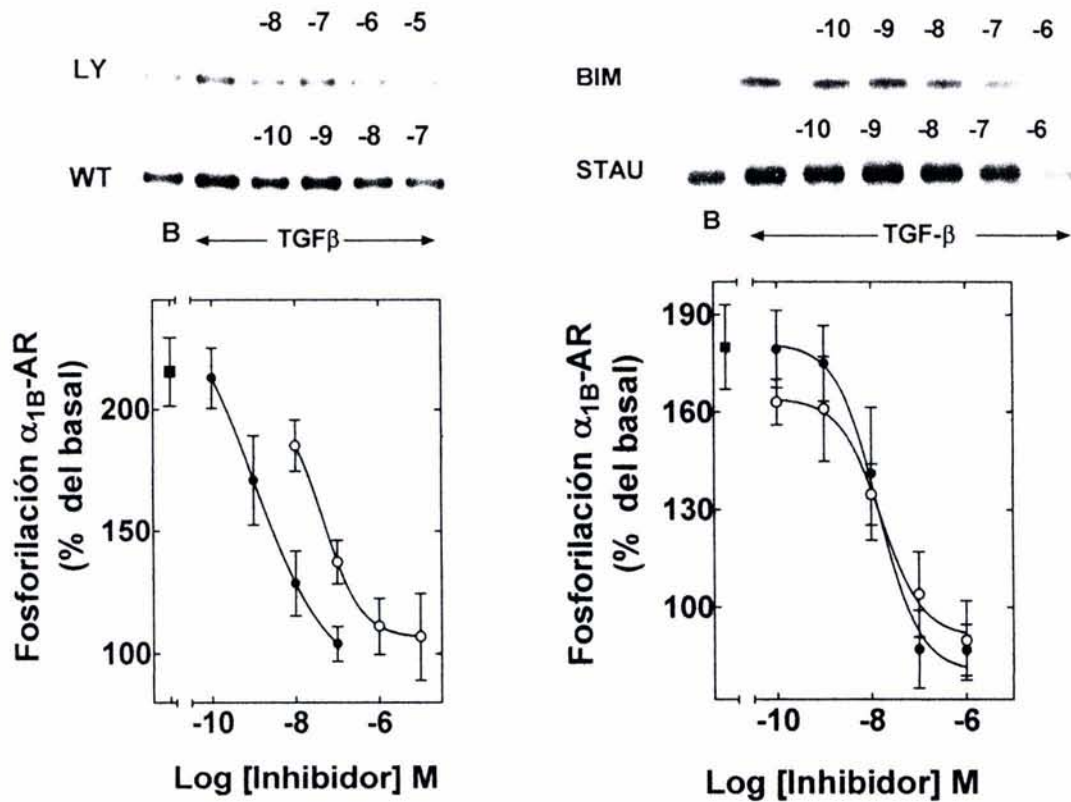


Figura 9. Curvas concentración-respuesta del efecto de los inhibidores de la PI3-K y de la PKC sobre la fosforilación inducida por el TGF- β . *Panel izquierdo:* las células Rat-1 que expresan los receptores para TGF- β y los receptores α_{1b} -adrenérgicos (endógenos y transfectados permanentemente) fueron marcados metabólicamente con [32 P]Pi e incubadas sin ningún agente (B) ó en presencia de 10 pM del TGF- β (■) ó con diferentes concentraciones de la wortmanina (WT; ●) ó del LY294002 (LY; ○) seguido de la estimulación con 10 pM del TGF- β durante 15 min. *Panel derecho:* las células fueron incubadas sin ningún agente (B) ó en presencia del TGF- β (■) ó con las diferentes concentraciones de la bisindolilmaleimida (BIM; ○) ó de estaurosporina (STAU; ●) durante 30 min seguida por la estimulación con 10 pM del TGF- β por 15 min. Se presenta una auto-radiografía representativa. En la gráfica se muestra el promedio y el error estándar de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado.

Para saber si la fosforilación inducida en los receptores α_{1b} -adrenérgicos por la activación de los receptores para el TGF- β tienen algún significado fisiológico se decidió determinar la movilización del Ca^{2+} intracelular y la producción de inositoles totales (IPs).

El efecto de la norepinefrina sobre la movilización de Ca^{2+} intracelular no fue modificado por el pretratamiento de las células con TGF- β , como se puede ver en la Figura 10, panel izquierdo parte superior. Al estimular con la norepinefrina a las células que expresan tanto los receptores α_{1b} -adrenérgicos como los del TGF- β se observó un claro aumento en la movilización de calcio dependiente de la concentración de norepinefrina, ver Figura 10. En las células que fueron pretratadas con 10 pM del TGF- β por 15 min y después estimuladas con concentraciones crecientes de la norepinefrina se observó que el pretratamiento con el TGF- β no afecta de manera significativa la respuesta α_1 adrenérgica promovida por la norepinefrina, ver Figura 10, panel derecho.

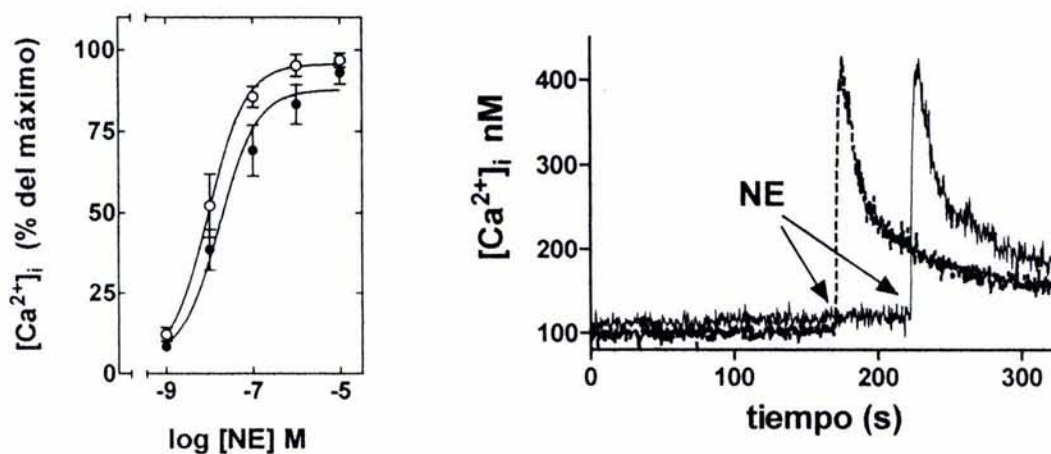


Figura 10. Efecto del TGF- β sobre el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la norepinefrina. Para la determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las células Rat-1 que expresan los receptores para TGF- β y los receptores α_{1b} -adrenérgicos fueron sembradas en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro, se incubaron con 5 μM de Fura-2/AM por 1 h a 37°C y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue cuantificada. *Panel izquierdo:* la curva concentración-respuesta para el efecto de la norepinefrina en la concentración de calcio intracelular en células incubadas 15 min en ausencia (O) ó presencia (●) de 10 pM del TGF- β . *Panel derecho:* se muestran los trazos representativos de la respuesta en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la estimulación de 10 μM de la norepinefrina NE (trazo de línea continua) y la preincubación por 15 min con 10 pM del TGF- β seguida de la estimulación con 10 μM de la NE (trazo de línea discontinua). Las gráficas representan los promedios y los errores estándar de 3-4 experimentos independientes.

Esta disminución en la respuesta a la norepinefrina se debe a que existe una desensibilización de la respuesta en calcio inducida por la activación de los receptores para el TGF- β .

Para el recambio de fosfoinosítidos en los fibroblastos Rat-1 se observó que existe una disminución de la respuesta medida como IPs totales, por lo que se puede decir que la magnitud de la respuesta promovida por la fosforilación del receptor es suficiente para desensibilizar al receptor α_{1b} -adrenérgico. Estos resultados confirman que efectivamente existe una fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos inducida por la activación de los receptores para TGF- β .

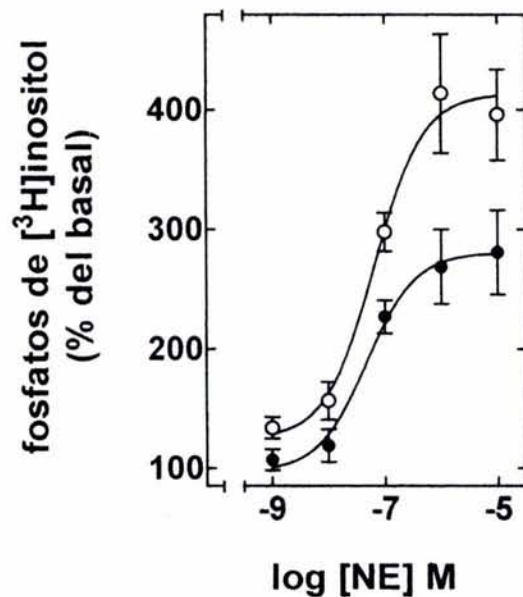


Figura 11. Efecto del TGF- β sobre la acumulación de fosfatos de $[^3\text{H}]$ inositol inducida por la norepinefrina. Para la determinación de los $[^3\text{H}]$ -fosfatos de inositol totales las células Rat-1 que expresan a los receptores para TGF- β y a los receptores α_{1b} -adrenérgicos se marcaron la noche anterior al experimento con $[^3\text{H}]$ mio-inositol en medio DMEM libre de inositoles. Al día siguiente se realizó una curva concentración-respuesta del efecto de la norepinefrina en la producción de IPs totales. Las células se incubaron 15 min en ausencia (O) ó presencia (●) de 100 pM del TGF- β . La gráfica muestra los promedios y los errores estándar de 3-4 experimentos independientes.

La fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el TGF- β ocurre por la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3K).

La PI-3K es un importante mediador de los procesos celulares modulados por fosforilación y se ha encontrado que participa en los procesos de desensibilización heteróloga. Nosotros hemos mostrado la posible participación de la PI-3K como uno de los pasos en el mecanismo por medio del cual el TGF- β induce la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico.

Para tratar de confirmar la participación tanto de la PKC como de la PI3-K se realizó la cotransfección de los receptores α_{1b} -adrenérgicos y de la mutante dominante negativa de la PI3-K ($\Delta p85$) en las células COS-1, así como la cotransfección de las mismas con el vector vacío para mantener constante la cantidad de cDNA. Con este procedimiento lo que encontramos es que la activación de los receptores para el TGF- β induce la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos transfectados y que esta fosforilación se bloquea por la presencia del inhibidor para la PKC, la bisindolilmaleimida al igual que con el inhibidor de la PI3-K, la wortmanina, como se muestra en la Figura 12, panel izquierdo.

Al cotransfectar a las células COS-1 con el cDNA de la mutante negativa y el cDNA de los receptores α_{1b} -adrenérgicos, se puede observar que el TGF- β no es capaz de inducir la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. En cambio, la fosforilación inducida por la norepinefrina sobre los receptores α_{1b} -adrenérgicos es muy similar a la observada cuando se expresan sólo a los receptores α_{1b} -adrenérgicos, ver Figura 12, panel derecho. Estos resultados coinciden con lo que se encontró en las células Rat-1.

Se intentó también la cotransfección en las células Rat-1 silvestres con el cDNA para los receptores α_{1b} -adrenérgicos y con el cDNA de la mutante dominante negativa, $\Delta p85$, sin embargo la eficiencia de transfección fue muy pobre, por lo que se decidió utilizar a las células COS-1, en las cuales obtuvimos una eficiencia del 70 al 80% y con ello se pudo determinar la participación de la PI3-K.

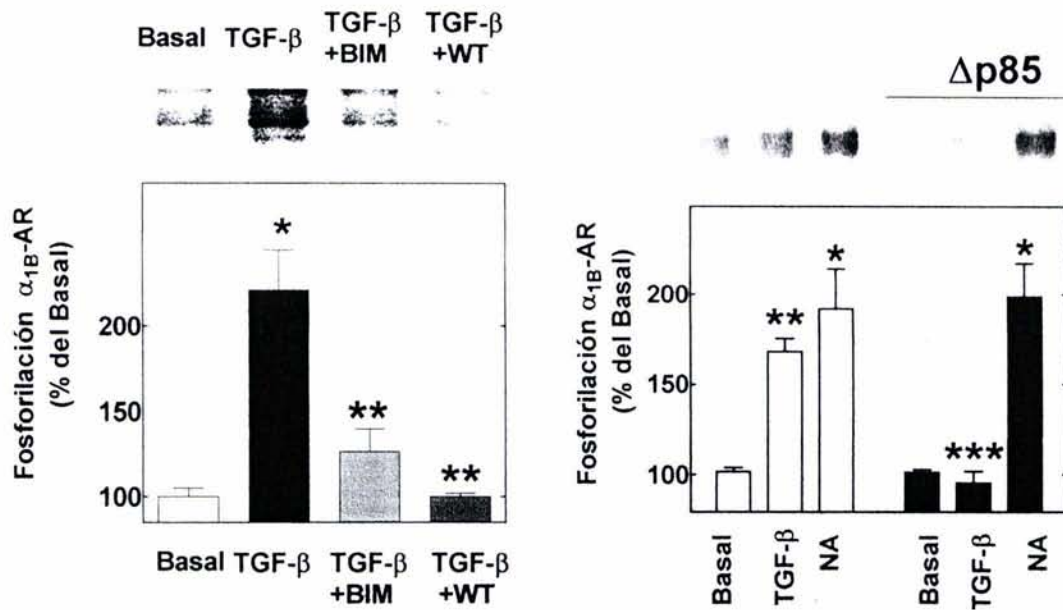


Figura 12. Efecto de los inhibidores de las proteínas cinasas sobre la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el TGF- β . *Panel izquierdo:* las células COS-1 que fueron transfectadas con el receptor α_{1b} -adrenérgico fueron incubadas sin ningún agente (Basal) ó en presencia de 10 pM del TGF- β solo ó con 1 μ M de la bisindolilmaleimida I (BIM) o con 100 nM de la wortmanina (WT). *Panel derecho:* las células COS-1 fueron cotransfectadas con cDNA del receptor α_{1b} -adrenérgico más el vector vacío y con el cDNA receptor α_{1b} -adrenérgico más el vector que lleva el cDNA de la dominante negativa $\Delta p85$. La gráfica muestra los promedios y los errores estándar de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado; *P<0.001 comparada con el basal; **P<0.001 comparada con el TGF- β .

Discusión

Nuestros resultados demuestran que los receptores α_{1b} -adrenérgicos pueden ser regulados por estímulos no adrenérgicos. En esta tesis se demuestra claramente que la activación de los receptores del TGF- β produce un aumento en el nivel de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, induciéndose su desensibilización como consecuencia de una regulación cruzada entre los receptores para el TGF- β y los receptores α_{1b} -adrenérgicos. Los receptores del TGF- β tienen actividad de cinasa en residuos de serina/treonina y su vía de señalización es a través de las proteínas Smads, mientras que los receptores α_{1b} -adrenérgicos están acoplados al recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} . Ya que estos dos receptores emplean diferentes vías de señalización, la existencia de una regulación cruzada entre ellos resulta novedosa.

La desensibilización y la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos por estímulos no adrenérgicos ha sido reportada previamente, así, por ejemplo, la activación de los receptores para la endotelina, ET_A , aumenta la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico y tal modificación produce una desensibilización de la respuesta α_{1b} -adrenérgica (Vázquez-Prado et al., 1998); los receptores para la bradicinina B_2 inducen la fosforilación, pero no producen una desensibilización de la respuesta α_{1b} -adrenérgica (Medina et al., 1998). Tanto los receptores para endotelina como los de bradicinina pertenecen a la familia de receptores acoplados a las proteínas $G_{q/11}$. Otro tipo de receptores que pertenecen a esta familia, pero que ejercen su acción a través de la proteína del tipo G_i , son los receptores para el ácido lisofosfatídico (LPA), que al ser activados por su ligando son capaces de inducir la fosforilación y desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico (Casas-González et al., 2000). Además de los receptores acoplados a proteínas G, existen otros receptores, como los del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y los del Factor Derivado de Plaquetas (PDGF), que tienen actividad intrínseca de proteína cinasa sobre residuos de tirosina y que al ser activados por sus ligandos respectivos son capaces de regular la respuesta α_{1b} -adrenérgica. El efecto que se observa es un aumento en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, lo que lleva a una clara disminución de su respuesta (Medina et al., 2000).

Al parecer existe una relación entre la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico y la desensibilización, pero este proceso aún no está comprendido totalmente. No sabemos por qué algunos agentes como la bradicinina inducen un aumento en la fosforilación del receptor pero no inducen su desensibilización. Es probable que la magnitud de la señal desencadenada por los receptores B_2 para la bradicinina no sea suficiente para inhibir la actividad del receptor α_{1b} -adrenérgico, o que la modificación del receptor inducida por los receptores de la bradicinina no promueva su desensibilización (Medina et al., 2000). Existen algunos antecedentes que sugieren que éste puede ser el caso, ya que se ha reportado que las cinasas GRK5 y GRK6 aumentan el nivel de fosforilación de los receptores α_{1B} -adrenérgicos sin modificar su actividad (Diviani et al., 1996). Por lo tanto, no todos los estímulos que aumentan la fosforilación del receptor promueven su desensibilización. Por ejemplo, la fosforilación de los receptores $5HT_{1A}$ por la PKC bloquea la capacidad de aumentar la movilización de Ca^{2+} intracelular sin que se afecte la inhibición de la adenilato ciclasa (Lembo et al., 1995). En las células HEK 293 transfectadas con el receptor μ -opiode se observa que la estimulación con el agonista produce un aumento en la fosforilación del receptor y que esta fosforilación no se correlaciona con la desensibilización de la respuesta inhibitoria de la adenilato ciclasa mediada por el receptor (Vouret-Craviari et al., 1995). De manera similar, la fosforilación de los receptores para el glutamato, $mglu_{\alpha 1}$, por la PKC inhibe la estimulación de la PLC por su agonista, pero no tiene efecto sobre la vía del AMPc (Francesconi et al., 2000).

El efecto del TGF- β sobre la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico se observa a concentraciones bajas, dentro del orden pM, que es la magnitud a la cual trabaja el TGF- β dentro del organismo (Massagué, 1998). La inducción de la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos por efecto de la activación de los receptores para el TGF- β es rápida pero transitoria. Este curso temporal no es consistente con la idea de que el TGF- β esté ejerciendo su acción a través de la vía de señalización clásica, en la que participan las proteínas Smads, lo que involucraría la transcripción de genes, así como la síntesis *de novo* de proteínas (Wrana et al., 1994). Esto nos lleva a suponer que participa otra(s) cinasa(s), o que el TGF- β emplea un mecanismo diferente. Además, la cinética de la fosforilación inducida por el TGF- β sobre los receptores α_{1b} -adrenérgicos es atractiva, ya que es más lenta que la fosforilación inducida por su agonista natural, la norepinefrina, que es más

rápida y además disminuye rápidamente en estas mismas células (Vázquez-Prado et al., 1996). La fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por el agonista es mediada principalmente por las GRKs (Krupnick et al., 1996), concretamente por las GRK2 y GRK3. La sobreexpresión de estas dos GRKs aumenta la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducida por la epinefrina, mientras que la sobreexpresión de la dominante negativa de la GRK2 (K220R) impide la fosforilación del receptor por el agonista (Diviani et al., 1997). Los sitios de la fosforilación inducida por el agonista se encuentran en las Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰ en la región carboxilo terminal del receptor α_{1B} -adrenérgico (Diviani et al., 1997).

Por otro lado, la fosforilación sobre el receptor α_{1b} -adrenérgico producida por ésteres de forbol es rápida y se sostiene por más tiempo (Vázquez-Prado et al., 1996). Los sitios de fosforilación por la PKC se encuentran en los residuos de serina específicos Ser³⁹⁴ y Ser⁴⁰⁰, localizados en el carboxilo terminal del receptor α_{1B} -adrenérgico (Diviani et al., 1997). La PKC cataliza también la fosforilación del receptor α_{1a} -adrenérgico (Vázquez-Prado et al., 2000), del receptor α_{1d} -adrenérgico (García-Sáinz et al., 2001), de los receptores AT₂ y AT₁ para la angiotensina II (Olivares-Reyes et al., 2000; García-Caballero et al., 2001) y de los receptores para somatostatina (Hipkip et al., 2000).

Dado que la PKC es un elemento regulador entre las diferentes vías de señalización y que diferentes procesos pueden activarla (García-Sáinz et al., 2000), el mecanismo propuesto para explicar la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos inducida por los receptores de EGF y LPA es a través de la participación secuencial de la PI3-K y de la PKC (Medina et al., 2000; Casas-González et al., 2000). De acuerdo con estos reportes, nosotros encontramos que los inhibidores de la PKC y de la PI3-K bloquean el efecto de fosforilación en los receptores α_{1b} -adrenérgicos inducida por la activación de los receptores del TGF- β , lo que sugiere que estas cinasas actúan de forma secuencial y no en caminos independientes, a diferencia del mecanismo que emplea el PDGF para promover la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, en el cual la PKC es esencial y la PI3-K no contribuye de manera importante (Medina et al., 2000).

La fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por la activación de la PKC ha sido ampliamente estudiada (Leeb-Lundberg et al., 1985; Diviani et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 1997; Medina et al., 2000; Vázquez-Prado et al., 2000; García-Sáinz et al.,

1999; García-Sáinz et al., 2000). Aunque no existe una evidencia directa sobre las isoformas de la PKC que participan en este mecanismo, se ha encontrado que las células Rat-1 expresan cuatro isoformas diferentes de la PKC (α , δ , ϵ , y ζ). Las isoformas α , δ y ϵ co-inmunoprecipitan con el receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico en condiciones basales, o al estimular con la norepinefrina, con la endotelina, con ésteres de forbol ó con alguna hormona que aumente el estado de fosforilación del receptor (Alcántara-Hernández et al., 1998), lo que sugiere que alguna(s) de esta(s) isoforma(s) pudiera ser la(s) responsables de las modificaciones del receptor por la activación de los receptores para el TGF- β .

La participación de la PKC en la fosforilación de los receptores $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgicos, inducida por la activación de los receptores del TGF- β vía la participación de la PI3K está fundamentada por la inhibición de la fosforilación inducida por el TGF- β al emplear los inhibidores específicos wortmanina y LY294002. La wortmanina se ha descrito como un potente inhibidor selectivo, no competitivo de la PI3-K (Powis et al., 1994) y el LY294002 es un inhibidor que compite por el sitio de unión al ATP de la cinasa (Vlahos et al., 1994). El empleo de la mutante dominante negativa de la subunidad adaptadora de la PI3-K, ($\Delta p85$) que carece del sitio de unión para la subunidad catalítica p110 confirmó la participación de la PI3-K (Barik et al., 2000).

En este trabajo, nosotros observamos que la fosforilación inducida por la activación del receptor para el TGF- β está asociada a la disminución de la respuesta máxima $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgica, medida como la producción de fosfatos de [3 H]-inositol (IPs), que se observa al pretratar a las células con el TGF- β . En cambio, al medir la movilización del Ca^{2+} intracelular en células pretratadas con el TGF- β , la respuesta no fue modificada totalmente; sólo se presentó un ligero desplazamiento de la curva concentración-respuesta a la estimulación $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgica. Estas diferencias pueden deberse al tiempo de estimulación de las células con la norepinefrina ya que mientras que para la producción de fosfatos de inositol el tiempo de estimulación es de 15 min y a continuación se detiene la reacción, en cambio para la movilización del Ca^{2+} intracelular la respuesta es inmediata al estímulo. Por lo que muy probablemente un pequeño aumento en la producción de los fosfatos de inositol sea suficiente para aumentar la concentración del Ca^{2+} intracelular.

Nuestros datos aportan evidencias sobre una posible regulación cruzada, *cross-talk*, entre los receptores para el TGF- β y los receptores $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgicos la cual no había sido

reportada con anterioridad. Existen reportes en los que se evidencia la participación del TGF- β en la regulación de otras vías, como, por ejemplo, en las células de músculo liso de tráquea humana y en los fibroblastos de corazón, en donde se expresan los receptores β -adrenérgicos; se observa que disminuye la acumulación de AMPc producida por el isoproterenol, un agonista β -adrenérgico (Nogami et al., 1994; Iisuka et al., 1995). En los miocitos, el TGF- β potencia el efecto de los receptores α_1 -adrenérgicos en la expresión del RNAm de *c-fos* con la participación de la PKC (Miki et al., 1994). En estudios en la línea celular A549 derivada de un carcinoma de pulmón humano, se ha demostrado que el TGF- β activa la expresión de genes de la matriz extracelular (PAI-1) a través de un mecanismo donde participa la fosfolipasa C de la fosfatidilcolina y la PKC (Halstead et al., Ignatz et al., 2000). En los fibroblastos Rat-2, el TGF- β induce la activación del elemento de respuesta a suero de *c-fos* (*c-fos* SER), mediante un mecanismo de transactivación en donde participa la PKC (Sung et al., 1999). En las células Mu1L μ , la activación directa de la PKC por el PMA produce una fosforilación de la Smad 3, inhibiendo su función como factor de transcripción (Yakymovych et al., 2001).

Recientemente se ha encontrado que en los astrocitos de rata el TGF- β regula los canales rectificadores de K⁺, Kirr2,3, a través de la participación de la PLC y de la PKC- δ (Perillan et al., 2002). La PKC interviene en diferentes sistemas de transducción, por ejemplo en las células PC-3, una línea celular derivada de un carcinoma prostático humano, en donde el TGF- β induce una inhibición parcial del crecimiento de las células. Este efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células se vió aumentado por la adición de PMA, lo que implica una probable participación de la PKC (Franzen et al., 1993).

Es posible que la activación de la PKC ocurra por la interacción directa con los fosfoinosítidos generados por la PI3-K: el PI[(3,4)]P₂ y el PI[3,4,5]P₃. Se ha demostrado que estos fosfoinosítidos son capaces de promover la activación de la isoenzimas de la PKC nuevas (δ , ϵ y η) y atípicas (ζ y λ) (Nakanishi et al., 1993). Además, los fosfolípidos generados por la activación de la PI3-K son moduladores de una cinasa intermediaria, la proteína cinasa-1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1), que también puede intervenir en el control de la PKC. La PDK1 se une con alta afinidad al PI[3,4,5]P₃ y fosforila a las PKC ζ y PKC δ *in vivo*. Además, las PKCs clásicas (α , β I y β II) se unen directamente a la PDK1, lo que sugiere que la enzima puede ejercer un control sobre diferentes isoenzimas

de la PKC (Chow et al., 1998). De esta forma los fosfoinosítidos fosforilados producidos por la actividad de la PI3-K actúan como moléculas de anclaje para el ensamble de las proteínas señal con una localización específica en la membrana, en respuesta a la estimulación de la célula.

El posible mecanismo que interviene en los efectos del TGF- β sobre los receptores $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgicos podría ser mediante una vía que involucre una participación secuencial de la PI3-K y de la PKC (ver Figura 13).

En algunos reportes se ha mostrado que la PI3-K es un blanco cascada abajo de la activación de los receptores para el TGF- β , en donde las cinasas Akt son las responsables de la actividad antiapoptótica de la insulina contra los efectos del TGF- β . Además, se ha descrito a la PI3-K como una vía de supervivencia celular, ya que actúa como un supresor de la muerte celular por su actividad apoptótica a través de la acción de la cinasa Akt sobre los residuos de serina/treonina (Chen et al., 2000).

En el pasado las investigaciones sobre los receptores habían sido realizadas generalmente en una dirección lineal, en base al sistema de transducción al cual se encontraban acoplados principalmente. Sin embargo, la aparición en la literatura de diversos reportes en donde se demuestra la complejidad en la red de las vías señalización, en las cuales se comparten tanto enzimas, como moléculas efectoras que les son comunes a varias vías de señales de transducción, permitiendo la interacción entre las mismas, lo cual produce múltiples combinaciones entre ellas, por lo que es necesario un estudio más amplio sobre estos procesos con el fin de entender mejor cómo es que suceden.

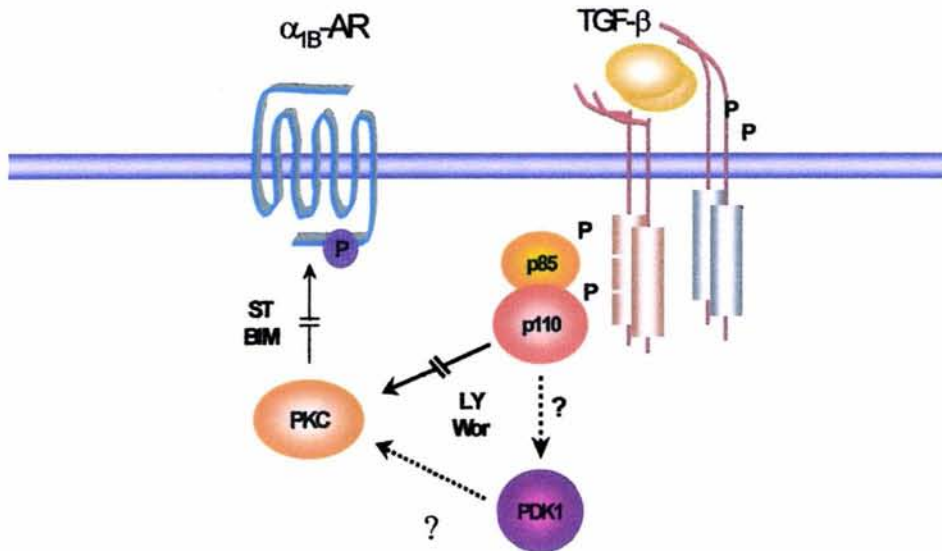


Figura 13. Modelo del mecanismo de regulación de los receptores del TGF- β sobre los receptores α_{1b} -adrenérgicos. La fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos, α_{1b} -AR, producida por la activación de los receptores para el TGF- β induce su desensibilización. Nuestros datos sugieren que el TGF- β induce la fosforilación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos por una vía que involucra la participación secuencial de las cinasas PI3K y PKC. Abreviaturas: la estaurosporina, ST; la bisindolilmaleimida, BIM; la wortmanina, Wor; el LY7973, LY; la subunidad reguladora de la PI3-K, p85; la subunidad catalítica de la PI3-K, p110.

Conclusiones

Nuestros resultados indican que en los fibroblastos Rat-1 los receptores α_{1b} -adrenérgicos son fosforilados significativamente como consecuencia de la activación de los receptores para el TGF- β . La acción de los receptores del TGF- β es mediada por la activación secuencial de la PI3-K y de la PKC, catalizando la fosforilación de residuos de serina en el receptor α_{1b} -adrenérgico. La modificación por fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico por el TGF- β se correlaciona con una desensibilización de la respuesta α_{1b} -adrenérgica en el recambio de fosfoinosítidos, mientras que la movilización del calcio intracelular no se afecta por el tratamiento con el TGF- β .

Bibliografía

Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B. (2003) Making sense of latent TGF- β activation. *J. of Cell Science* 116: 217-224.

Alcántara-Hernández, R., Leyva-Illades, D., García-Sáinz, J.A. (2001) Protein kinase C- α_{1b} -adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate. *Eur. J. Pharmacol.* 419: 9-13.

Attisano, L. and Wrana, J.L. (2000) Smads as transcriptional co-modulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 235-243.

Awaji, T., Hirasawa, A., Kataoka, M., Shinoura, H., Nakayama, Y., Sugawara, T., Izumi S. Tsujimoto, G. (1998) Real-time Optical Monitoring of Ligand-Mediated Internalization of α_{1b} -Adrenoceptor with Green Fluorescent Protein. *Mol. Endo.* 12: 1099-1111.

Barak, L.S. Ferguson, S.S.G., Zhang, J., Caron, M.G. (1997) β -Arrestin/Green Fluorescent Protein Biosensor for Detecting G Protein-coupled Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* 267: 27497-27500.

Barik, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmicks, N.A., Moses, H.L. Arteaga C.L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* 275: 36803-36810.

Benovic J.L., Pike L.J., Cerione R.A., Staniszewski C., Yoshimasa T., Codina J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 260: 7094 -7101.

- Blobe**, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F. (2000) Role of transforming growth factor β in human disease. *J. Med.* 342: 1350-1358.
- Briggs**, J.R., Kraft, A.S (1999) The role of the Smad 3 protein in phorbol ester-induced promoter expression. *J. Biol. Chem.* 274: 36987–36994.
- Bundey**, R.A., and Nahorski, S.R. (2001) Homologous and heterologous uncoupling of muscarinic M(3) and α_{1B} adrenoceptors to $G\alpha_{q/11}$ in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 134:257-264.
- Bouvier**, M., Leeb-Lundberg, L.M., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. II. Effects of agonist occupancy on phosphorylation of alpha 1- and beta 2-adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 262: 3106-3113.
- Bockaert**, J., Pin, J.P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors and evolutionary success. *Embo J.* 18:1723-1729.
- Casas-González**, P., Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A. (2000) Lysophosphatidic acid modulates α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation and function: Roles of Gi and phosphoinositide 3-Kinase. *Mol. Pharmacol.* 57:1027-1033.
- Castagna**, M., Takai Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851.
- Corvera**, S., García-Sáinz, J.A. (1984) Phorbol ester inhibit α_1 -adrenergic regulation of hepatocyte metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:1128-1133.
- Chakrabarty** S., Huang S. (1995) Role of protein kinase C alpha in the induction of carcinoembryonic antigen by transforming growth factor beta 1. *J. Cell. Physiol.* 164:148-153.
- Chen**, Y.G., Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N. Massagué, J. (1998) Determinants of specificity in TGF- signal transduction. *Genes. Dev.* 12: 2144–2152.

Chen, R.H., Chang, M.C., Su, Y.H., Tsai, Y.T., Kuo, M.L. (1999) Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J. Biol. Chem.* 274: 23013-23019.

Chen, Y.G. Massagué, J. (1999) Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-family receptors. *J. Biol. Chem.* 274: 3672–3677.

Choi, Sung-E., Choi, Eui-Yul., Kim, Pyeung-Hyeun., K., Jae-Hong. (1999) Involvement of protein pinase C and Rho GTPase in the nuclear signalling pathway by transforming growth factor- β 1 in Rat-2 fibroblast cells. *Cell. Signal.*: 71-76.

Chow, M.M., Hou, W., Johson, J., Graham, L.K., Lee, M.H., Chen, C.S., Newton, A.C., Schaffhausen, B.S., Toker, A. (1998) Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* 8: 1069-1077.

Chuang, T.T., Iacovelli, L., Sallese, M., De Blasi, A. (1996) G Protein-Coupled receptors: Heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 416-421.

de Caestecker, P. Parks,W., Frank,C.J., Castagnino, P., Bottaro, D.P., Roberts, A.B., Lechleider, R.J. (1998) Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev.* 12:1587-92.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Vandenheede, J.R., McDowell, H.E., Hundal, H.S, Cohen, P. (1994) The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem. J.* 303:21-6.

Derynck, R., Gelbart, W.M., Harland, R.M., Heldin, C.H., Kern, S.E., Massagué, J., Melton, D.A., Mlodzik, M., Padgett, R.W., Roberts, A.B., Smith, J., Thomsen, G.H., Vogelstein, B. Wang, X.F. (1996) Nomenclature: vertebrate mediators of TGF family signals. *Cell* 87: 73.

Disatnik, M.H., Jones, S.N. Mochly-Rosen, D. (1995) Stimulus-dependent subcellular localization of activated protein kinase C; a study with acidic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta 1 in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27: 2473-2481.

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

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

Domin, J., Waterfield, M.D. (1997) Using structure to define the function of phosphoinositide-kinase family members. *FEBS Lett.* 410: 91-95.

Dubois, C. M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L. E., Leduc, R. (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertasa. *J. Biol. Chem.* 270: 10618-10626.

Ferguson, S.S.G., Downey, III W.E., Colapietro, A.M., Barak, L.S., Ménard, L., Caron, MG. (1996) Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271: 363-365.

Ferguson, S.S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53:1-24.

Fruman, D.A., Meyers., R.E, Cantley., L.C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 481-507.

García-Caballero, A., Olivares-Reyes, J.A., Catt, K.J., García-Sáinz, J.A. (2001) Angiotensin AT(1) receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Roles of protein kinase C and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* 59: 576-585.

García-Sáinz, J.A., Macías-Silva, M. (1995) Species heterogeneity of liver α_1 -adrenoreceptors: Subtypes, signal transduction and regulation. *Pharmacol. Commun.* 6:53-60.

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

García-Sáinz J.A., Vázquez-Cuevas F.G., Romero-Avila, M.T. (2001) Phosphorylation and desensitization of α_{1D} -adrenergic receptors. *Biochem.* 353: 603-610.

Gonzalez A.L, Joly E. (1995) A simple procedure to increase efficiency of DEAE-dextran transfection of COS cells. *Trends Genet.* 6: 216-7.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.

Halsteal, J., Kemp, K., and Ignatz, R. (1995) Evidence for involvement of phosphatidylcholine-phospholipase C and protein kinase C in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* 270: 13600-13603.

Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T.R., Waterfield, M.D. Kasuga, M. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for Ras activation in VHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7415-7419.

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A Jr., Wrana, J.L., Falb, D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signaling. *Cell* 89: 1165-1173.

Heldin, C., Miyazomo, K., ten Dijke, P. (1997) TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-447.

Hieble, J.P., Bylund, D. B., Clarke, D. E., Eikenburg, D. C., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Ruffolo Jr, R. R. (1995) International Union of Pharmacology X.

Recommendations for nomenclature of α_1 -adrenoreceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.* 47: 267-270.

Hofmann J. (1997). The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* 11: 649-669.

Howell, M., Itoh, F., Pierreux, C.E., Valgeirsdottir, S., Itoh, S., ten Dijke, P., Hill, C.S. (1999) *Xenopus* Smad4 beta is the co-Smad component of developmentally regulated transcription factor complexes responsible for induction of early mesodermal genes. *Dev. Biol.* 214: 354-369.

Ignotz, R., Honeyman. (2000) TGF-beta signaling in A549 lung carcinoma cells: lipid second messengers. *J. Cell. Biochem.* 78: 588-594.

Iizuka, K., Kawaguchi, H., Murakami, T., Kitabatake, A. (1995) Effect of transforming growth factor beta-1 on the intracellular calcium in cardiac fibroblasts. *Jpn. Heart J.* 36: 101-109.

Kanashiro C.A, Khalil R.A. (1998) Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25: 974-985.

Kingsley, D.M., (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8: 133-14.

Kirchhausen, T. (2000) "Clathrin." *Annu. Rev. Biochem.* 69: 699-727.

Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J.A. Lefkowitz R.J. (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of β_2 -adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.* 272: 5-8.

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

Kucich, U., Rosenbloom, J.C., Herrick, D.J., Abrams, W.R., Hamilton, A.D., Sebti, S.M, Rosenbloom J. (2001) Signaling events required for transforming growth factor-beta

stimulation of connective tissue growth factor expression by cultured human lung fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 395:103-112.

Laemmli, E.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lattion, A.L., Diviani, D., Cotecchia, S. (1994) Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 22887-22893.

Leeb-Lundberg, L.M., Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M.G., Lefkowitz, R. J. (1987) Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist-promoted desensitization and phosphorylation of alpha 1-adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 262: 3098-105.

Leeb-Lundberg, L.M., Cotecchia, S., Lomasney, J.W., DeBernardis, J.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1985) Phorbol esters promote alpha 1-adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:5651-5655.

Lembo, P.M., Albert, P.R. (1995) Multiple phosphorylation sites required for pathway-selective uncoupling of the 5-hydroxytryptamine 1A receptor by protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* 48: 1024-1029.

LeSueur, L.A., Graff, J.M. (1999) Spemann organizer activity of Smad 10. *Development* 126: 354-369.

Lo, R.S., Massagué, J. (1999) Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad 2. *Nature Cell Biol.* 1: 472-478.

Loshe, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. *J. Biol. Chem.* 267: 8558-8564.

- Lowry**, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R. J., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Manning**, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
- Masuyama**, N., Hanafusa, H., Kusakabe, M., Shibuya, H., Nishida, E. (1999) Identification of two Smad4 proteins in *Xenopus*. Their common and distinct properties. *J. Biol. Chem.* 274: 12163-12170.
- Massagué**, J. (1990) The transforming growth factor. beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597- 613.
- Massagué**, J. (1998) TGF- β Signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791.
- Massagué**, J. Chen, Y.G. (2000) Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev.* 14: 627-644.
- Medina**, L.C., Vázquez-Prado, J., Torres-Padilla, M.E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz-Muñoz, M.E. García-Sáinz, J.A. (1998). Cross-talk: phosphorylation of α_{1b} -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett.* 422: 141-145.
- Mellor**, H., Parker P.J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332: 281-292.
- Miki**, N., Hamamori, M.N., Hirata, K., Suematsu, M., Kawashima, S., Akita, H., Yokoyama, M. (1994) Transforming growth factor-beta potentiated alpha-1 adrenergic and stretch-induced *c-fos* mRNA expression in rat myocardial cells. *Circ. Resp.* 75: 8-14.
- Minneman**, K.P., Esbenshade, T.A. (1994) α_1 -Adrenergic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 17-133.
- Murphy-Ullrich**, J. E. Poczatek, M. (2000) Activation of latent TGF-beta by Thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11: 59-69.
- Nakanishi**, H., Brewer, K.A. and Exton J.H. (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268: 13-16.

- Nakashima, K.,** Yanagisawa, M., arakawa, H., kimura, N., Hisatswune, T., Kawabata, M., Miyasono, K., Taga, T. (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad 1 complex bridged by p300. *Science* 284:479-482.
- Nogami, M.,** Romberger, D.J., Rennard, S.I., Toews, M.L. (1994) TGF-Beta modulates beta-adrenergic receptor number and function en cultured human tracheal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 266: 187-191.
- Nguyen, V.A., T, Gao B.** (1999) Cross-talk between α_{1b} -adrenergic receptor (α_{1b} -AR) and interleukin-6 (IL-6) signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274: 35492-35498.
- Oakley, R.H.,** Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G. (1999) Association of β -Arrestin with G Protein-coupled Receptors during Clathrin-mediated Endocytosis Dictates the Profile of Receptor Resensitization. *J. Biol. Chem.* 274: 32248-32257.
- Oakley, R.H.,** Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., Barak, L.S. (2000) Differential Affinities of Visual Arrestin, β Arrestin1, and β Arrestin 2 for G Protein-coupled Receptors Delineate Two Major Classes of Receptors. *J. Biol. Chem.* 275: 17201-17210.
- Olivares-Reyes, J.A.,** Jayadev, S., Hunyady L., Catt, K.J., Smith, R.D (2000) Homologous and heterologous phosphorylation of the AT(2) angiotensin receptor by protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* 58: 1156-1161.
- Perillan, P.R.,** Chen, M., Potts, E.A., Simard, J.M. (2002) Transforming growth factor-beta 1 regulates Kir2.3 inward rectifier K⁺ channels via phospholipase C and protein kinase C-delta in reactive astrocytes from adult rat brain. *J. Biol. Chem.* 277: 1974-1980.
- Persson, U.,** Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engstrom, U., Heldin, C.H., Funahashi, K., ten Dijke P. (1998). The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett.* 434: 83-87.
- Pierce, K.L.,** Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639-50.

Pitcher, J.A., Payne, E.S., Csontos, C., De Paoli-Roach, A.A. Lefkowitz, R.J. (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8343-8347.

Powis, G., Bonjouklian, R., Bergren, M.M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W.F., Dodge, J., Grindey, G. Vlahos, C.J. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Res.* 54: 2419-2423.

Premont, R.T., Inglese, J., Lefkowitz, R.J. (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* 9:175-82.

Roberts, A.B. (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner. Electrolyte Metab.* 24:111-119.

Rendón, E., Robles, M. (2001) Activación de la familia de proteínas cinasas C: avances y perspectivas. *BEB* 20:19-29.

Sakanaka, C., Ferby, I., Waga, I., Bito, H., Shimizu, T. (1994) On the mechanism of cytosolic phospholipase A2 activation in CHO cells carrying somatostatin receptor: wortmannin-sensitive pathway to activate mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30:18-23.

Seed B., Aruffo A. (1987) Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 3365-3369.

Shi, Y., Massagué, J. (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.

Stadel, J.M., Nambi, P., Shorr, R.G., Sawyer, D.F., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1985) Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the beta-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3173-3177.

Stadel, J.M., Rebar, R., Shorr, R.G., Nambi, P., Crooke, S.T., (1986) Biochemical characterization of phosphorylated beta-adrenergic receptors from catecholamine-desensitized turkey erythrocytes. *Biochemistry.* 25: 3719-24.

- Vanhaesebroeck, B.,** Leever, S.J., Panayotou, G., Waterfield, M.D. (1997) Phosphoinositide 3-Kinase: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22: 262-272.
- Vanhaesebroeck, B.,** Welham M. J., Kotani K., Stein R., Warne P.H., Zvelebil M. J., Higashi, H., Volina S., Downward, J. Waterfield, M.D. (1997) p110 delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 4330-4335.
- Vanhaesebroeck, B.,** Waterfield, M.D. (1999) Signaling by distinct classes phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* 253: 239-254.
- Vázquez-Prado, J.,** García-Sáinz J.A. (1996) Effect of phorbol myristate acetate on α_1 -adrenergic action in cells expressing recombinant α_1 -adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 50: 17-22.
- Vázquez-Prado, J.,** Medina, L.C., García-Sáinz J.A. (1997) Activation of endothelin ET_A receptors induce phosphorylation of α_{1b} -adrenergic receptor. *J. Biol.Chem.* 272:27330-27337.
- Vázquez-Prado, J.,** Medina, L.C., Romero-Avila M.T., González-Espinosa C., García-Sáinz J.A. (2002) Norepinephrine and phorbol ester-induced phosphorylation of α_{1a} -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 272: 27330-27337.
- Vlahos, C.J.,** Matter, W.F., Hui, K.Y. Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269: 5241-5248.
- Wrana, J.L.,** Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massagué, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370: 341-347.
- Welsh, G.I.,** Foulstone, E.J., Young, S.W., Tavaré, J.M., Proud, C.G. (1994) Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.* 303:15-20.

- Wymann, M.P.,** Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436: 127-150.
- Xiang, B.,** Yu, G.H, Guo, J., Chen, L., Hu, W., Pei, G., Ma, L. (2001) Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *Biol. Chem.* 76: 4709-4716.
- Yakymovych, I.,** Ten Dijke, P., Heldin, C.H., Souchelnytskyi, S. (2001) Regulation of Smad signaling by protein kinase C. *FASEB J.* 15:553-5.
- Yamamoto, S.,** Yan, F., Zhou, H., Tai, H.H. (2002) Agents that elevate cyclic AMP induce receptor phosphorylation primarily at serine 331 in HEK 293 cells overexpressing human thromboxane receptor alpha. *Biochem. Pharmacol.* 64: 375-83.
- Yano, H.,** Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y Matsuda, Y. (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268:25846-25856.
- Zimmerman, C.M.,** Padgett, R.W. (2000) Transforming growth factor β signaling mediators and modulators. *Gene* 249: 17-30.
- Zhu, H.,** Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., Thomsen, G.H. (1999) A Smad ubiquitin ligase targets the BMP pathway and effects embryonic pattern formation. *Nature* 400:687-693.

α_{1B} -Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor- β

M. Teresa ROMERO-ÁVILA, C. Fabián FLORES-JASSO and J. Adolfo GARCÍA-SÁINZ¹

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

Transforming growth factor- β (TGF- β) induced α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation in Rat-1 fibroblasts stably expressing these adrenoceptors. This effect of TGF- β was rapid, reaching a maximum within 30 min and decreasing thereafter, and concentration-dependent (EC_{50} 0.3 pM). The phosphoinositide 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002, and the protein kinase C inhibitors staurosporine, Ro 318220 and bisindolylmaleimide, blocked the effect of this growth factor. α_{1B} -Adrenergic receptor phosphorylation was associated with desensitization, as indicated by a reduction in the adrenergic-mediated production of [³H] inositol phosphates. Phosphorylation of α_{1B} -adrenergic receptors

by TGF- β was also observed in Cos-1 cells transfected with the receptor. Co-transfection of the dominant-negative mutant of the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase ($\Delta p85$) inhibited the phosphorylation of α_{1B} -adrenergic receptors induced by TGF- β . Our results indicate that activation of TGF- β receptors induces α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation and desensitization. The data suggest that phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C play key roles in this effect of TGF- β .

Key words: adrenaline, cross-talk, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C.

INTRODUCTION

G-protein-coupled receptors constitute one of the major families in the mammalian genome [1]. They play primary roles in the perception by the organism of external stimuli such as light, odours and tastes, and in cell-to-cell communication mediating the response to many hormones and neurotransmitters. Control of receptor function is a cardinal event in the adaptation of whole organisms and individual cells to changes in the external and internal milieu, and to the overall maintenance of homeostasis.

α_1 -Adrenergic receptors (α_1 -ARs) mediate many of the actions of adrenaline and noradrenaline, such as the smooth muscle contraction that maintains vascular tone, and the regulation of hormone secretion and of intermediary metabolism [2]. They also participate in the pathogenesis of diseases, such as hypertension and benign prostatic hypertrophy [2]. Therefore knowledge about the molecular events that control their function is of major importance for the understanding of the physiological balance that we call health, and its perturbations during disease.

This family of receptors consists of three members, the α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1C} -ARs, which mediate their actions mainly via the phosphoinositide-turnover/calcium-mobilization pathway [2–5]. The function of these ARs is modulated through phosphorylation via G-protein-coupled receptor kinases and second messenger-dependent kinases such as protein kinase C (PKC) ([6–13]; reviewed in [14]). Differences in sensitivity to phosphorylation and desensitization have been observed among these receptor subtypes [12,15].

The α_{1B} -AR (hamster) was the first receptor of the α_1 subfamily to be cloned [16], and it has been studied to a much greater extent than the other subtypes. G-protein-coupled receptor kinases 2 and 3 seem to be involved in the phosphorylation of agonist-

occupied α_{1B} -ARs during homologous desensitization [17,18]. The phosphorylation sites involved have been located at Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ and Ser⁴¹⁰ in the receptor C-terminus [7].

In heterologous desensitization, activation of non-adrenergic receptors desensitizes α_{1B} -ARs, and this has also been associated with receptor phosphorylation (reviewed in [14]). Direct activation of PKC by active phorbol esters markedly desensitizes α_{1B} -ARs and leads to a pronounced increase in receptor phosphorylation [6–12,14]. The sites phosphorylated by PKC have been located at Ser³⁹⁴ and Ser⁴⁰⁰ of the α_{1B} -AR C-terminus [7]. A variety of receptors have also been observed to induce α_{1B} -AR phosphorylation. Thus we have shown that activation of seven-transmembrane-domain receptors coupled to G_{q/11} (such as endothelin ET_A receptors [8]) or G_i (e.g. lysophosphatidic acid receptors [10]) or of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity (e.g. epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) receptors [11]) can induce α_{1B} -AR phosphorylation/desensitization. PKC and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) are key participants in these effects (reviewed in [14]).

In the present work, we studied the effect of activation of receptors of a different class, the transforming growth factor- β (TGF- β) receptors, on α_{1B} -AR phosphorylation/desensitization. TGF- β 1–3 constitute a family of growth factors involved in the control of cell differentiation, proliferation and apoptosis [19–21]. These growth factors signal through the activation of heteromeric type I and type II receptors that are serine/threonine kinases. In the presence of TGF- β , the constitutively active type II receptor phosphorylates and activates the type I receptor. The activated type I receptor phosphorylates receptor-associated Smads (Smad2 and Smad3), which then bind Smad4, and the complex translocates to the nucleus where it regulates the transcription of target genes [19–21]. Interestingly, there are some rapid actions of TGF- β that do not seem to involve gene transcription or *de*

Abbreviations used: α_1 -AR, α_1 -adrenergic receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EGF, epidermal growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; SH, Src homology; TGF- β , transforming growth factor- β .

¹To whom correspondence should be addressed (e-mail agarcia@ifisiol.unam.mx).

in vivo protein synthesis [22–24]. PKC and PI3K have been reported to play a role in some of these actions and in other longer-term effects of this growth factor [23–27].

EXPERIMENTAL

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), G418, fetal bovine serum and other reagents used for cell culture were obtained from Gibco BRL. TGF- β 1 and TGF- β 2 were from RD Systems. (–)-Noradrenaline, staurosporine, wortmannin and protease inhibitors were from Sigma Chemical Co. Ro 318220, LY294002 and bisindolylmaleimide 1 were from Calbiochem. [32 P]P_i (8500 Ci/mmol), [3 H]prazosin (74.4 Ci/mmol) and *myo*-[2,3- 3 H]inositol (22.9 Ci/mmol) were from New England Nuclear Life Science Products. Fura-2 acetoxymethyl ester was from Molecular Probes. Protein A Sepharose beads were from Upstate Biotechnology. DNA purification kits were from Qiagen. The hamster α_{1B} -AR cDNA [16], kindly provided to us by Dr Robert J. Lefkowitz, was subcloned into pcDNA3 as described [12]. The SR α - Δ p85 plasmid containing the cDNA of the mutant p85 subunit of PI3K lacking the p110 binding site (Δ p85) was kindly provided to us by Dr Wataru Ogawa and Dr Masato Kasuga [28].

Cell culture

Rat-1 cells transfected with the hamster α_{1B} -AR [16] were generously provided by Dr R. J. Lefkowitz, Dr M. G. Caron and Dr L. Allen. Cells were grown at confluence in 10-cm culture dishes in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, G418 (300 μ g/ml), streptomycin (100 μ g/ml), penicillin (100 units/ml) and amphotericin B (0.25 μ g/ml) under a 5% CO₂/95% air atmosphere at 37 °C. Cos-1 cells were cultured in the same medium but in the absence of G418. Transient transfection into Cos-1 cells was performed using DEAE-dextran [29]; experiments were performed 48–72 h after transfection, with an efficacy of 60–80%, as described in [12]. Total plasmid DNA was maintained at 3 μ g per 10 cm Petri dish using 1.5 μ g of plasmid containing the α_{1B} -AR cDNA and 1.5 μ g of plasmid containing the Δ p85 cDNA or the empty vector. For all the experiments, confluent cells were serum-deprived overnight in unsupplemented DMEM. α_{1B} -ARs were expressed at a density of \sim 1 pmol/mg of membrane protein in Rat-1 cells, and \sim 2 pmol/mg of membrane protein in Cos-1 cells, as determined by [3 H]prazosin binding, with K_D values in the range 0.15–0.3 nM [12].

Determination of α_{1B} -AR phosphorylation

Rat-1 cells expressing α_{1B} -ARs were incubated in phosphate-free DMEM for 1 h, and then labelled in the same medium containing [32 P]P_i (50 μ Ci/ml) for 3 h at 37 °C, as described previously [8–12]. In this procedure, a rabbit antiserum against the C-terminal decapeptide of the hamster α_{1B} -AR was used [8]. This antiserum immunoprecipitates α_{1B} -ARs with high efficacy (\sim 80% of photolabelled receptors) [8]; the receptors were detected as a broad band of \sim 80–85 kDa [8]. In brief, following treatment with inhibitors and/or agonists, cells were washed with ice-cold PBS and lysed for 1 h on ice in lysis buffer containing 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.05% SDS, 50 mM NaF, 100 μ M

Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phosphoserine, 1 mM phosphothreonine and protease inhibitors (20 μ g/ml leupeptin, 20 μ g/ml aprotinin, 100 μ g/ml PMSF, 500 μ g/ml bacitracin and 50 μ g/ml soybean trypsin inhibitor). Cell lysates were centrifuged at 12700 g for 15 min, and the supernatants were incubated with the anti- α_{1B} -AR antiserum and Protein A-Sepharose overnight at 4 °C. After five washes with buffer containing 50 mM Hepes, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.05% SDS and 100 mM NaF, followed by a final wash with 50 mM Tris/150 mM NaCl, pH 7.4, the immune complexes were denatured by boiling in SDS sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol, and subjected to SDS/PAGE. The gels were dried and exposed for 3–24 h at -70 °C using X-Omat X-ray films and intensifying screens. The level of receptor phosphorylation was assessed in the same gels with Molecular Dynamics PhosphorImager and Imagequant software.

Measurement of intracellular free Ca²⁺ concentration

Confluent fibroblasts were incubated overnight in DMEM without serum and antibiotics. Cells were loaded with 5 μ M fura-2 acetoxymethyl ester in Krebs–Ringer/Hepes containing 0.05% BSA, pH 7.4, for 1 h at 37 °C. Cells were detached by gentle trypsinization, and fluorescence measurements were carried out as described previously [12] using an Aminco-Bowman Series 2 spectrometer with the excitation monochromator set at 340 and 380 nm, a chopper interval of 0.5 s, and the emission monochromator set at 510 nm. The intracellular free Ca²⁺ concentration was calculated as described in [30] using the software provided by Aminco-Bowman; traces were exported directly to the graphs.

[3 H]inositol phosphate production

Cells were labelled with [3 H]inositol (5 μ Ci/ml) for 18–24 h in inositol-free DMEM containing 1% (v/v) fetal bovine serum. On the day of the experiment, cells were washed twice with Krebs–Ringer/Hepes buffer containing 1.3 mM CaCl₂ and preincubated for 20 min in 2 ml of the same buffer containing 20 mM LiCl at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Incubations were for 15 min and were terminated by the addition of 2 ml of chloroform/methanol (1:2, v/v); samples were mixed thoroughly and centrifuged in a clinical centrifuge. The aqueous phase was recovered and total [3 H]inositol phosphates were separated by Dowex AG1-X8 chromatography [31].

RESULTS

Incubation of Rat-1 cells stably expressing the α_{1B} -AR with 10 pM TGF- β 1 induced an increase in the phosphorylation of the AR that was evident at 5 min, reached its maximum within 15 min and had vanished by 60 min (Figure 1). A similar effect was observed in a few experiments performed using TGF- β 2 (results not shown). The effect of TGF- β was concentration-dependent, with an EC₅₀ of 0.3 pM, and reached its maximum at 10 pM (Figure 1).

This effect of 10 pM TGF- β was blocked by 100 nM staurosporine, 1 μ M bisindolylmaleimide 1, 1 μ M Ro 318220 or 100 nM wortmannin (Figure 2). Wortmannin and LY294002, inhibitors of PI3K, blocked the receptor phosphorylation induced by 10 pM TGF- β in a concentration-dependent fashion; the EC₅₀ values were 1 nM and 50 nM respectively (Figure 3). Similarly, the PKC inhibitors staurosporine and bisindolylmaleimide 1

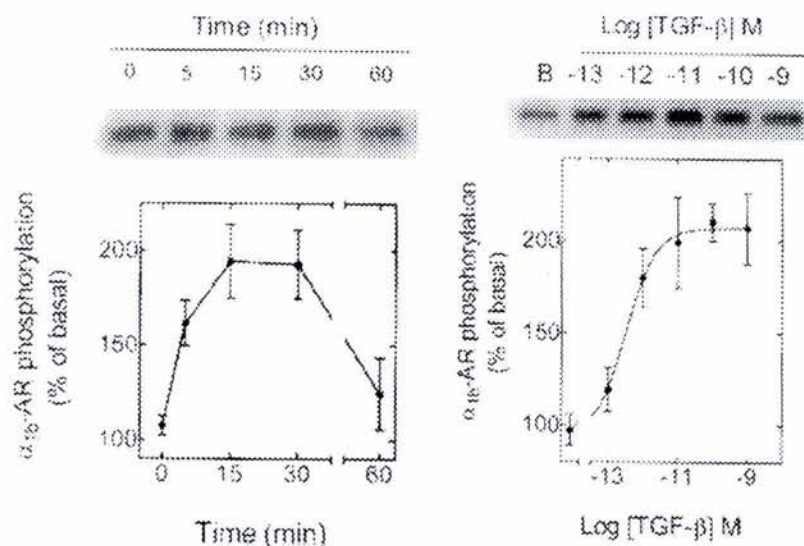


Figure 1 Effect of TGF- β on α_{1B} -AR phosphorylation

Left panel: cells were incubated in the absence or presence of 10 pM TGF- β for the times indicated. Right panel: cells were incubated with the indicated concentrations of TGF- β for 15 min. Plotted are the means \pm S.E.M. of triplicate determinations of 6–8 experiments using different cell cultures. Representative autoradiographs are shown.

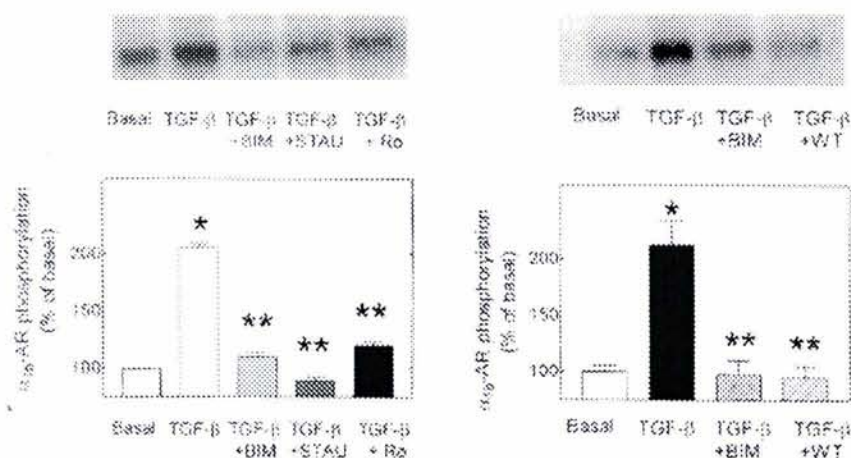


Figure 2 Effect of protein kinase inhibitors on TGF- β -induced α_{1B} -AR phosphorylation

Left panel: cells were incubated in the absence of any agent (Basal) or in the presence of 10 pM TGF- β alone or with 1 μ M bisindolylmaleimide I (BIM), 100 nM staurosporine (STAU) or 1 μ M Ro 318220 (Ro). Plotted are the means \pm S.E.M. of triplicate determinations of 6–7 experiments using different cell cultures. * P < 0.001 compared with control; ** P < 0.001 compared with TGF- β . A representative autoradiograph is shown. Right panel: cells were incubated in the absence of any agent (Basal) or in the presence of 10 pM TGF- β alone or with 1 μ M bisindolylmaleimide I (BIM) or 100 nM wortmannin (WT). Plotted are the means \pm S.E.M. of triplicate determinations of 3–4 experiments using different cell cultures. * P < 0.001 compared with control; ** P < 0.001 compared with TGF- β . A representative autoradiograph is shown.

blocked the α_{1B} -AR phosphorylation induced by TGF- β with nearly identical EC_{50} values of \sim 15 nM (Figure 3). These inhibitors by themselves had no effect on basal receptor phosphorylation at the concentrations tested (results not shown; see [8–12]).

In order to determine whether the α_{1B} -AR phosphorylation induced by TGF- β has functional metabolic consequences, the effects of noradrenaline on intracellular cell calcium and [3 H] inositol phosphate production were tested. As shown in Figure 4

(upper left panel), incubation of the cells for 15 min with 100 pM TGF- β did not alter in a significant way the increase in intracellular calcium induced by 1 μ M noradrenaline. The concentration–response curve to the adrenergic agonist showed that TGF- β induced only a small shift to the right (EC_{50} values of 60 and 100 nM in cells preincubated in the absence and presence respectively of 100 pM TGF- β for 15 min). Nevertheless, when [3 H]inositol phosphate production was tested, a clear decrease in the maximal response to noradrenaline was observed in cells

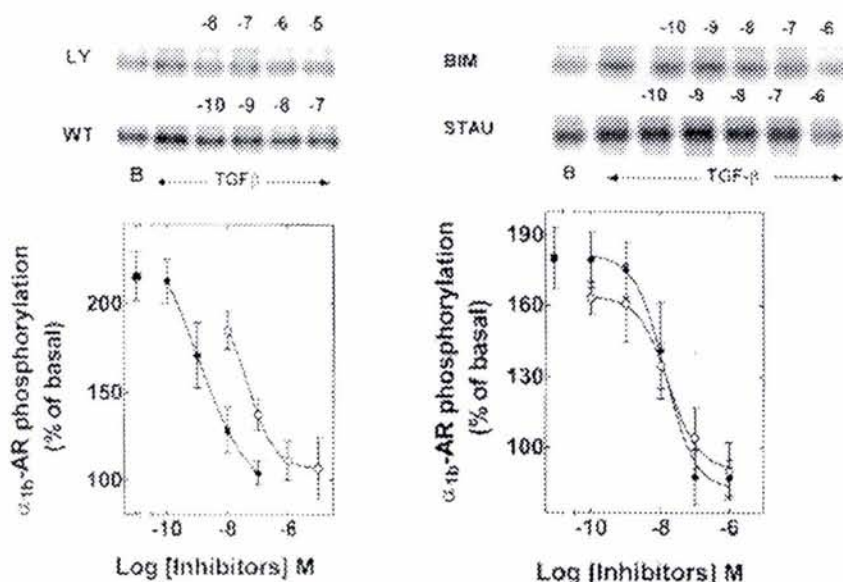


Figure 3 Concentration–response curves for the effects of PI3K and PKC inhibitors on TGF- β -induced α_{1b} -AR phosphorylation

Left panel: cells were incubated in the absence of any agent (B) or in the presence of 10 pM TGF- β alone (■) or with different concentrations of wortmannin (WT, ●) or LY294002 (LY, ○). Right panel: cells were incubated in the absence of any agent (B) or in the presence of 10 pM TGF- β alone (■) or with different concentrations of staurosporine (STAU, ●) or bisindolylmaleimide I (BIM, ○). Plotted are the means \pm S.E.M. of triplicate determinations of 3–4 experiments using different cell cultures. Representative autoradiographs are shown.

incubated with TGF- β : no significant change was observed in the EC_{50} values, i.e. \sim 50 nM under both conditions (Figure 4, lower panel).

PI3K seems to play a key role in the TGF- β -mediated phosphorylation of α_{1b} -ARs. Therefore, in order to further document its participation, we used transfection of a dominant-negative mutant of the enzyme [28]. We attempted to perform these experiments with the Rat-1 cell line, but the efficacy of transfection was too low. Therefore we performed these experiments using Cos-1 cells co-transfected with the α_{1b} -AR and either the dominant-negative PI3K mutant or an identical amount of empty vector. As shown in Figure 5 (right panel), TGF- β was able to induce α_{1b} -AR phosphorylation in Cos-1 cells transfected with α_{1b} -ARs. This effect was blocked by the PI3K inhibitor wortmannin and by the PKC inhibitor bisindolylmaleimide I, which confirmed the data obtained with Rat-1 cells. The inhibitors by themselves were without effect (results not shown). When cells were co-transfected with the $\Delta p85$ mutant of PI3K, the ability of TGF- β to increase α_{1b} -AR phosphorylation was lost (Figure 5, left panel). The AR phosphorylation induced by noradrenaline was similar in cells transfected with or without the PI3K mutant (Figure 5, left panel).

DISCUSSION

The present data indicate that activation of TGF- β receptors increased α_{1b} -AR phosphorylation and thus induced receptor desensitization. Phosphorylation and desensitization of α_{1b} -ARs has been observed previously in response to activation of $G_{q/11}$ -coupled receptors such as the ET $_A$ endothelin receptors [8], G_i -coupled receptors such as lysophosphatidic acid receptors [10], and receptors with intrinsic tyrosine kinase activity such as those for EGF and PDGF [11]. In the present study, receptors

belonging to a different family, i.e. those with intrinsic serine/threonine kinase activity, were studied. The data show clearly that activation of these receptors can also modulate the α_{1b} -AR sensitivity of cells.

There seems to be a relationship between α_{1b} -AR phosphorylation and desensitization, but as yet it is far from fully understood. Thus agents that induce a small increase in receptor phosphorylation, such as bradykinin, do not induce receptor desensitization [9]. This can be explained if only some site(s) or a fraction of the receptors are affected. However, okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases, or overexpression of G-protein-coupled receptor kinase 5 or 6 markedly increased receptor phosphorylation, but such covalent modifications do not seem to alter receptor function [17,32]. In the present study we observed that the TGF- β -mediated AR phosphorylation was associated with a decrease in the maximal adrenergic effect on [3 H]inositol phosphate production and a small shift to the right of the concentration–response curve to noradrenaline for intracellular calcium. This difference could be due to the time frames of agonist action (immediate for intracellular calcium and 15 min for [3 H]inositol phosphate production), and to the fact that a small increase in inositol trisphosphate could be sufficient to induce a near-maximal increase in intracellular calcium.

The effect of TGF- β was observed at low concentrations, and it was relatively rapid and transient in a short time frame. This time course is not consistent with the idea that it could be mediated through the classic TGF- β signalling pathway involving gene transcription and *de novo* protein synthesis. As mentioned in the Introduction, there is evidence that additional signalling events may participate in the action of this growth factor [22–27]. In agreement with these findings, we observed that inhibitors of PKC and PI3K effectively blocked the α_{1b} -AR phosphorylation induced by TGF- β : the IC_{50} values were similar to what was

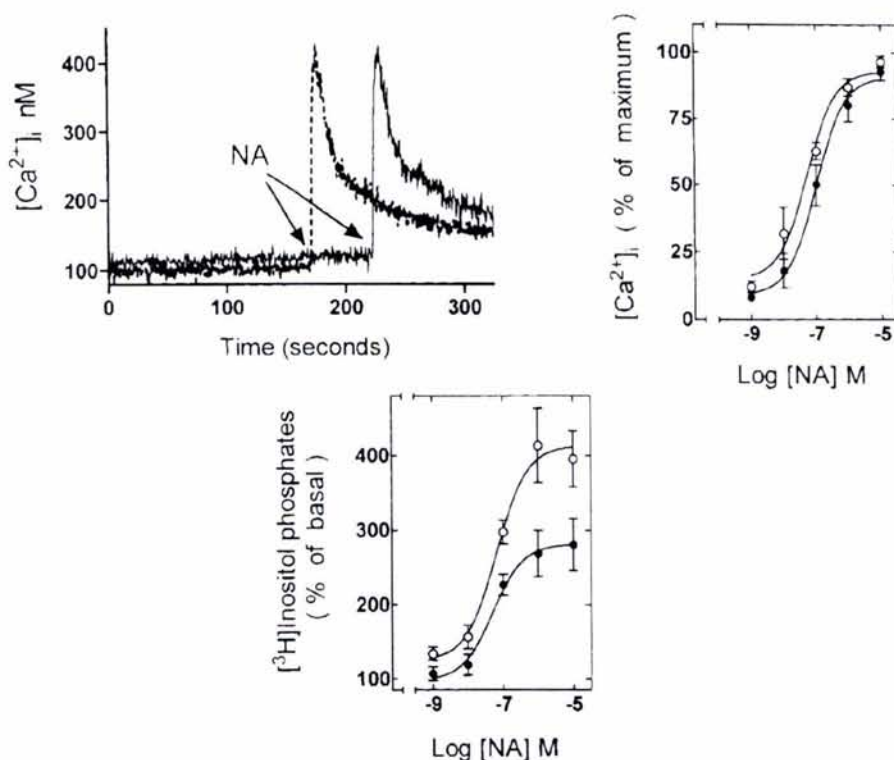


Figure 4 Effects of TGF- β on α_{1B} -AR-mediated functional responses

Upper left panel: fura-2-loaded cells were incubated in the absence (solid line) or presence (dashed line) of 10 pM TGF- β for 15 min and then challenged with 1 μ M noradrenaline (NA; arrow). Representative traces are shown. Upper right panel: concentration-response curves to noradrenaline for intracellular calcium. Cells were incubated for 15 min in the absence (\circ) or presence (\bullet) of 10 pM TGF- β before being challenged with the indicated concentrations of noradrenaline (NA). Results are presented as a percentage of the maximum increase observed in response to noradrenaline in control cells. Plotted are the means \pm S.E.M. of 4–5 experiments using different cell preparations. Lower panel: concentration-response curves to noradrenaline for [3 H]inositol phosphate production. Cells were incubated for 15 min in the absence (\circ) or presence (\bullet) of 10 pM TGF- β before being challenged with the indicated concentrations of noradrenaline (NA). Plotted are the means \pm S.E.M. of 4–5 experiments using different cell cultures.

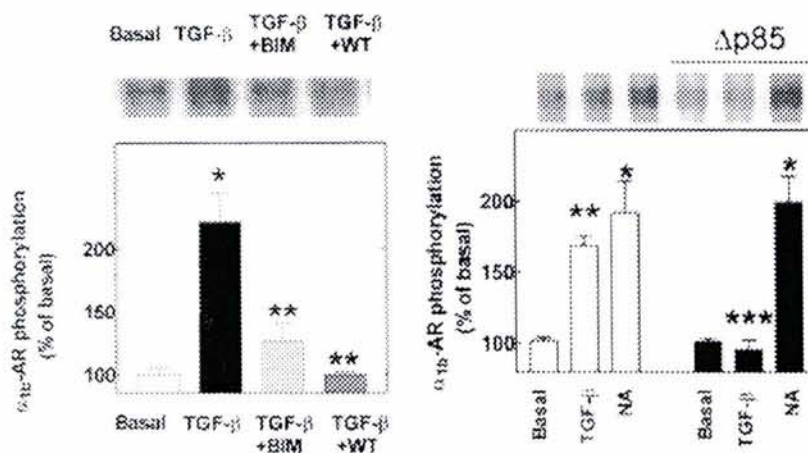


Figure 5 Effects of protein kinase inhibitors on TGF- β -induced α_{1B} -AR phosphorylation

Left panel: Cos-1 cells transfected with the hamster α_{1B} -AR were incubated in the absence of any agent (Basal) or in the presence of 10 pM TGF- β alone or with 1 μ M bisindolylmaleimide I (BIM) or 100 nM wortmannin (WT). Plotted are the means \pm S.E.M. of triplicate determinations from four experiments using different cell cultures; * P < 0.001 compared with basal; ** P < 0.001 compared with TGF- β alone. A representative autoradiograph is shown. Right panel: Cos-1 cells co-transfected with the hamster α_{1B} -AR and empty vector (\square) or the Δ p85 PI3K dominant-negative kinase (\blacksquare) were incubated in the absence of any agent (Basal) or in the presence of 10 μ M noradrenaline (NA) or 10 pM TGF- β . Plotted are the means \pm S.E.M. of triplicate determinations of 7–9 experiments using different cell cultures; * P < 0.001; ** P < 0.01 compared with basal; *** P < 0.001 compared with TGF- β without Δ p85. A representative autoradiograph is shown.

anticipated and within the ranges observed previously by us [8–12]. As observed previously for α_{11c} -AR phosphorylation induced by lysophosphatidic acid and EGF [10,11], inhibitors of PKC and PI3K completely blocked the effect of TGF- β . This suggests that these kinases act in a sequence and not in independent pathways.

There is a large body of experimental evidence indicating that PKC phosphorylates α_{11c} -ARs [6–14]. PKC comprises a large family of enzymes with differences in sensitivity to activators and in substrate specificity [33,34]. There is no direct evidence with regard to the isoforms that participate in α_{11c} -AR phosphorylation. Nevertheless, we have observed that the α , δ and ϵ isoforms of PKC co-immunoprecipitate with α_{11c} -ARs under basal conditions, and this association is dynamically increased by cell treatment with phorbol esters or hormones that increase receptor phosphorylation [35]. These data indicate that several PKC isoforms participate in this process, and suggest the possibility that they may participate in different steps or that functional redundancy may exist. It should be mentioned that a recent publication presented experimental evidence that seriously questions the selectivity of many protein kinase inhibitors [36]. In the present work we used three different PKC inhibitors, and the EC_{50} values were similar to what would be expected. However, in view of the above-mentioned finding [36], the possibility that other protein kinases may be involved cannot be ruled out.

PI3K is a family of enzymes with fundamental roles in signalling and the regulation of cellular activity [33,34]. These enzymes comprise catalytic and adaptor/regulatory subunits. In Class IA, the adaptor p85 subunit has Src homology 2 (SH2) and SH3 motifs that bind phosphotyrosine residues and the p110 catalytic subunit [37,38]. Our present data using PI3K inhibitors or transfection of the Ap85 dominant-negative mutant strongly indicate a role for PI3K in the phosphorylation and desensitization of α_{11c} -ARs induced by TGF- β . Wortmannin is a potent and selective non-competitive inhibitor of PI3K [39], whereas LY294002 is an inhibitor that competes at the binding site of ATP of this kinase [40]. The Δ p85 dominant-negative mutant of PI3K lacks the binding site for the catalytic subunit p110, and interferes with its interaction with tyrosine-phosphorylated residues [28]. These three inhibitors of PI3K clearly and consistently blocked α_{11c} -AR phosphorylation, underscoring the importance of this enzyme activity as a modulator of the AR phosphorylation state.

PI3K is a modulator of PKC activity through the synthesis of 3-phosphorylated phosphoinositides. These phospholipids are important modulators of phosphoinositide-dependent protein kinase 1, which phosphorylates the activation loop of some PKC isoforms [41,42]. 3-Phosphorylated phosphoinositides have also been reported to activate novel and atypical PKC isoforms [41,42].

The mechanism(s) through which TGF- β activates PI3K is not yet fully understood. Some authors have suggested that it takes place through indirect actions, not involving tyrosine phosphorylation [27]. Nevertheless, it is known that TGF- β stimulates Src kinase activity, increasing protein tyrosine phosphorylation [22]. On the other hand, it has been observed by several authors that PI3K p85 and PI3K activity co-immunoprecipitate with TGF- β receptors [25,26].

It has been elegantly demonstrated that activation of receptors for insulin or for insulin-like growth factor I leads to β_2 -AR desensitization associated with AR tyrosine phosphorylation ([43,44]; reviewed in [45]). A key hierarchical role for protein kinase B (Akt) in this effect has recently been described [46]. Similarly, we have shown that activation of other tyrosine kinase receptors, such as those for EGF or PDGF, leads to desensitiza-

tion of α_{11c} -ARs [11]. As shown here, activation of TGF- β receptors, which have endogenous serine/threonine kinase activity, modulates a G-protein-coupled receptor.

In summary, the present data show that TGF- β induces α_{11c} -AR phosphorylation and desensitization. The data suggest the following working model: activation of TGF- β receptors, directly or indirectly, stimulates PI3K activity; this leads to activation of PKC, which phosphorylates and desensitizes α_{11c} -ARs.

This research was partially supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (36230 N) and Programa de Apoyo a Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica (IN205199). We thank Dr Fernando López for the generous donation of the initial samples of TGF- β 1 and TGF- β 2 used in this work, and Dr R. J. Lefkowitz, Dr M. G. Caron, Dr L. Allen, Dr W. Ogawa and Dr M. Kasuga for the indicated cells and plasmids.

REFERENCES

- Boeckert, J. and Pini, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**, 1723–1729.
- García-Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J. and Villalobos-Molina, R. (1999) α_1 -Adrenoceptors: subtypes, signaling and roles in health and disease. *Arch. Med. Res.* **31**, 449–456.
- Piascik, M. T. and Perez, D. M. (2001) α_1 -Adrenergic receptors: new insights and directions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 403–410.
- Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J. and Piascik, M. T. (1996) α_1 -Adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function and signalling. *Circ. Res.* **78**, 737–749.
- Zhong, H. and Minneman, K. P. (1999) α_1 -Adrenoceptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **375**, 261–276.
- Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., Lomasney, J. W., DeBernardis, J. F., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1985) Phorbol esters promote α_1 -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 5651–5655.
- Diviani, D., Lattion, A. L. and Cotecchia, S. (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase and protein kinase C-mediated desensitization of the α_{1B} adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 28712–28719.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L. C. and García-Sáinz, J. A. (1997) Activation of endothelin ET_A receptors induce phosphorylation of α_{1B} adrenoceptors in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 27330–27337.
- Medina, L. C., Vázquez-Prado, J., Torres-Padilla, M. E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz-Muñoz, M. E. and García-Sáinz, J. A. (1996) Cross-talk: phosphorylation of α_{1B} adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett.* **422**, 141–145.
- Casas-González, P., Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J. A. (2000) Lysophosphatidic acid modulates α_{1B} adrenoceptor phosphorylation and function. Roles of G β and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* **57**, 1027–1033.
- Medina, L. C., Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J. A. (2000) Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and α_{1B} adrenoceptors. *Biochem. J.* **350**, 413–419.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L. C., Romero, M. T., González-Espinosa, C. and García-Sáinz, J. A. (2000) Norepinephrine and phorbol ester-induced phosphorylation of α_{1B} adrenergic receptors. Functional aspects. *J. Biol. Chem.* **275**, 6553–6559.
- García-Sáinz, J. A., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado, J. and Romero-Ávila, M. T. (1999) Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human α_{1B} adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **385**, 263–271.
- García-Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J. and Medina, L. C. (2000) α_1 -Adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **389**, 1–12.
- Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J. A. (1996) Effect of phorbol myristate acetate on α_1 adrenergic action in cells expressing recombinant α_1 adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **50**, 17–22.
- Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Kobilka, B. K. (1986) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 7159–7163.
- Diviani, D., Lattion, A. L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J. L. and Cotecchia, S. (1996) Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_{1B} adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 5049–5056.
- Iacovelli, L., Franchetti, R., Grisolia, D. and De Biasi, A. (1999) Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signalling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, α_{1B} adrenergic and A1 adenosine receptor-mediated responses. *Mol. Pharmacol.* **56**, 316–324.

19. Massacré, J. (2000) How cells read TGF β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 169–178.
20. Wakefield, L. M. and Roberts, A. B. (2002) TGF β signaling: positive and negative effects of tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 22–29.
21. Altshuler, L. and Wrana, J. L. (2000) Smads as transcriptional co-modulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 235–243.
22. Kim, J. I. and Joo, G. K. (2002) Involvement of cell-cell interactions in the rapid stimulation of cas tyrosine phosphorylation and Src kinase activity by transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* **277**, 31938–31948.
23. Peullart, P. R., Chen, M., Potts, E. A. and Simard, J. M. (2002) Transforming growth factor β regulates Kir2.3 inward rectifier K⁺ channels via phospholipase C and protein kinase C delta in reactive astrocytes from adult rat brain. *J. Biol. Chem.* **277**, 1974–1980.
24. Axmann, A., Seidel, D., Reimann, T., Hempel, U. and Wenzel, K.-W. (1998) Transforming growth factor β 1-induced activation of the rat-MEK-MAPK signaling pathway in rat lung fibroblasts via a PKC-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 456–460.
25. Bakiri, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. and Arteaga, C. L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* **275**, 36603–36610.
26. Krymskaya, V. P., Hoffman, R., Eszternas, A., Ciocca, V. and Panettieri, R. A. (1997) TGF β 1 modulates EGF-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **273**, L1220–L1227.
27. Higaki, M. and Shimokado, K. (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for growth factor induced amino acid uptake by vascular smooth muscle cells. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2127–2132.
28. Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T. R. et al. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 7415–7419.
29. González, A. L. and Joly, E. (1995) A simple procedure to increase efficiency of DEAE dextran transfection of COS cells. *Trends Genet.* **11**, 216–217.
30. Strykowski, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450.
31. Berridge, M. J., Dawson, R. M. G., Downes, P., Heslop, J. P. and Irvine, R. F. (1983) Changes in the level of inositol phosphates after agonist dependent hydrolysis of membrane phospholipids. *Biochem. J.* **212**, 473–482.
32. Alcántara-Hernández, R., Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz, J. A. (2000) Protein phosphatase/protein kinase interplay modulates α_{1A} -adrenoceptor phosphorylation: effects of Glutamic acid. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 724–730.
33. Newton, A. C. (1995) Protein kinase C: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**, 26495–26498.
34. Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P. and Parker, P. J. (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK. *Science* **281**, 2042–2045.
35. Alcántara-Hernández, R., Leyva-Illades, D. and García-Sáinz, J. A. (2001) Protein kinase C α_{1A} -adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate. *Eur. J. Pharmacol.* **419**, 9–13.
36. Davies, S. P., Reddy, H., Cavano, M. and Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**, 95–105.
37. Wymann, M. P. and Pirella, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 127–150.
38. Chow, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S. and Toker, A. (1998) Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* **8**, 1069–1077.
39. Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W. F., Dodge, J., Grindey, G. and Vlahos, C. J. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Res.* **54**, 2419–2423.
40. Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241–5248.
41. Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Galfrey, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D. et al. (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* **7**, 776–789.
42. Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B., Galfrey, P. R., Reese, C. B., McCormick, F., Tempst, P. et al. (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**, 710–714.
43. Hadcock, J. R., Perl, J. D., Gelman, M. S. and Malbon, C. C. (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**, 26017–26022.
44. Karoor, V. and Malbon, C. C. (1996) Insulin like growth factor receptor-1 stimulates phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor in vivo on sites distinct from those phosphorylated in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **271**, 29347–29352.
45. Morris, A. J. and Malbon, C. C. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.* **79**, 1373–1430.
46. Doronin, S., Shumay, E., Wang, H. Y. and Malbon, C. C. (2002) Akt mediates sequestration of the β_2 -adrenergic receptor in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **277**, 15124–15131.

Received 3 July 2002/11 September 2002; accepted 17 September 2002

Published as BJ Immediate Publication 17 September 2002; DOI 10.1042/BJ20021052