



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“FOSFORILACION Y DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR ALFA 1B ADRENERGICO A TRAVES DEL RECEPTOR DE INSULINA”

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGA

PRESENTA:

TZINDILU MOLINA MUÑOZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ

m340185

2005

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Tzindilú Molina

FECHA: 20 enero 2005

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

" Fosforilación y desensibilización del receptor alfa 1B adrenérgico
a través del receptor de insulina "

realizado por Tzindilú Molina Muñoz

con número de cuenta 9520099-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Propietario

Dra. Ma. Teresa Romero Ávila

Propietario

Dra. Marina Macías Silva

Suplente

Dra. Claudia González Espinosa

Suplente

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Consejo Departamental de BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular bajo la Dirección del Dr. Adolfo García Sáinz y con el apoyo de la Dra. Ma. Teresa Romero Ávila.

El proyecto fue realizado con apoyo de los donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN-206302) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (36230-N)

A Arturo con todo mi amor

A Emiliano por ser la inspiración de todo

A mis padres por el amor y apoyo que siempre me han brindado

A mis hermanos Gustavo y Abraham por todos los momentos compartidos

A mis queridas abuelitas Lupita y María

A mi abuelo Adolfo donde quiera que este

A María Eugenia con cariño

Y a todo mi familia

GRACIAS...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Adolfo García Sáinz por haberme permitido realizar mi trabajo de licenciatura, así como por el apoyo y confianza que me ha brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. María Teresa Romero Ávila por su ayuda en la realización de este trabajo y por su valiosa y honesta amistad.

A todos los amigos y compañeros del laboratorio: Tere, Ekaterina, Beatriz, Lupita, Rocío, Alejandro, Erendira, Alieshia, Cristian, Patricia, Claudio.

A las Dras. Marina Macias, Claudia González, Rocío Salceda por sus observaciones y revisión de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias

A todos mis compañeros de la carrera

Índice	1
Abreviaturas	3
Resumen	4
Introducción	
Receptores acoplados a proteínas G	5
Proteínas G	5
Vías de transducción de señales de receptores acoplados a proteínas G.....	7
Receptores adrenérgicos.....	11
Síntesis y metabolismo de catecolaminas	14
Importancia fisiológica de los receptores adrenérgicos.....	16
Regulación de la actividad de los receptores alfa 1 adrenérgicos	18
Receptores con actividad de tirosina cinasa.....	23
Receptor de insulina.....	24
Insulina.....	27
Antecedentes	29
Hipótesis.....	31
Objetivos.....	31
Materiales y métodos.....	32
Resultados.....	38

Discusión.....	49
Conclusiones.....	54
Bibliografía.....	55

Abreviaturas

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

NE: Norepinefrina

GTP: Guanosina trifosfato

ATP: Adenosina de trifosfato

AMPc: Adenosina monofostato cíclico

Ca²⁺: Ión calcio

GRK: Cinasa específica de receptores acoplados a proteínas G

PKC: Proteína cinasa C

PKA: Proteína cinasa A

IR: Receptor de insulina

IRS1: Sustrato 1 del receptor de insulina

PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa

IP3: Inositol trifosfato

DAG: Diacilglicerol

MAPKS: Proteína cinasa activada por mitógenos

PLC: Fosfolipasa C

ET: Receptor de endotelina

LPA: Receptor de ácido lisofosfatídico

TGF-β-: Factor de crecimiento transformante beta

RESUMEN

Nuestro grupo ha demostrado que los receptores α_{1B} -adrenérgicos son regulados por fosforilación en respuesta a la activación de otros receptores acoplados a proteínas G (bradicidina, endotelina), receptores con actividad de cinasa de residuos de serina/treonina (TGF- β) y receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (EGF y PDGF). En este trabajo se encontró que otro receptor con actividad de cinasa de tirosina, el de la insulina, es capaz de ejercer este tipo de regulación sobre los receptores α_{1B} -adrenérgicos en dos líneas celulares: las DDT1MF2 que expresan endógenamente a los receptores de insulina y a los α_{1B} -adrenérgicos; y las células Rat-1 que expresan endógenamente a los receptores de insulina y tienen transfectados establemente a los α_{1B} -adrenérgicos. La estimulación de ambas líneas con insulina induce la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, lo que se traduce en una desensibilización de la respuesta a la norepinefrina, evidenciada por una disminución en la producción de segundos mensajeros. Los inhibidores de la proteína cinasa C y de la fosfoinositido-3-cinasa, bloquean la fosforilación y la desensibilización funcional de los receptores α_{1B} adrenérgicos inducida por la insulina. Este tipo de regulación puede tener implicaciones fisiológicas importantes ya que los receptores de insulina y los α_{1B} -adrenérgicos son expresados en tejidos, como el hígado.

INTRODUCCIÓN

Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son proteínas de membrana que controlan la acción de una gran variedad de mensajeros, como hormonas, neuropéptidos, neurotransmisores, sustancias odoríferas y de otros estímulos del medio ambiente, como la luz. Estos receptores constituyen una familia compuesta por más de 1000 receptores diferentes, entre los que se encuentran los de rodopsina, el muscarínico, para acetilcolina, el receptor de endotelina y los receptores adrenérgicos, por mencionar algunos (Ullrich, 1999).

Los GPCRs están conformados por siete dominios transmembranales con una estructura de alfa-hélice, cada uno de 20 a 25 residuos de aminoácidos hidrofóbicos, alternados por tres asas extracelulares y 3 intracelulares; cuentan con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular. Presentan un sitio de unión al ligando formado por varios de los dominios transmembranales de la alfa-hélice (Ullrich, 1999).

Proteínas G

Cuando se lleva a cabo la unión del ligando a un receptor de este tipo, se produce el acoplamiento con proteínas G, que se conocen así ya que unen nucleótidos de guanina. Existen dos tipos principales de proteínas G, las monoméricas, de bajo peso molecular como Ras y Rho y las proteínas G heterotriméricas de alto peso

molecular, que están asociadas a la transducción de señales de receptores con siete dominios transmembranales. Las proteínas G heterotriméricas están formadas estructuralmente por tres subunidades diferentes, una alfa ($G\alpha$), que une e hidroliza GTP y por las subunidades beta-gama ($G\beta\gamma$) que se encuentran fuertemente unidas entre sí (Ham y Gilchrist, 1996). Tanto la subunidad $G\alpha$ como el dímero $G\beta\gamma$ regulan la actividad de las moléculas efectoras (la adenilil ciclasa o la fosfolipasa C- β). La subunidad $G\alpha$ permanece activa hasta que el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad, lo que lleva a la reasociación del heterotrímero, pasando a su estado inactivo (Ham y Gilchrist, 1996).

Las proteínas $G\alpha$ se han dividido en diferentes clases: la clase $G\alpha_s$ que estimula a la adenilil ciclasa y a canales de calcio; la clase $G\alpha_i$ que inhiben a la adenilil ciclasa, regula canales de potasio y calcio; y la clase $G\alpha_q$ que activa a la fosfolipasa C y $G\alpha_{12}$ que regula el intercambio de sodio-potasio (Neer, 1995).

El dímero $G\beta\gamma$ lleva a cabo funciones importantes en los procesos de señalización, ya que siendo un complejo proteico sin actividad enzimática, es capaz de modular a diferentes proteínas efectoras; como por ejemplo, a la adenilil ciclasa, a la que puede activar o inhibir (Chen, et al. 1995), también es capaz de activar a proteínas cinasas como la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y a las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Luttrell et al., 1996), y/o activar canales iónicos.

VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Sistema de Fosfoinosítidos-Calcio

En esta vía el agonista se une al receptor que luego de sufrir un cambio conformacional, se acopla y activa a la proteína Gq, las subunidades de la proteína sufren un cambio conformacional y la subunidad α promueve la activación de la fosfolipasa C- β que se encuentra localizada en la membrana celular; esta enzima lleva a cabo la hidrólisis del fosfolípido fosfatidilinositol, 4-5 bifosfato (PIP₂), lo que conduce a la formación de dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El IP3 activa a su receptor-canal ubicado en el retículo endoplásmico y libera calcio que junto con el DAG producido activan a la proteína cinasa C (PKC). La producción de estos segundos mensajeros lleva a cabo la amplificación de la señal mediante cascadas intracelulares que permite a las células tener un control preciso y regulado de sus funciones fisiológicas. Algunos ejemplos de receptores acoplados al sistema de fosfoinosítidos calcio, son los receptores α_{1B} adrenérgicos, los de rodopsina, los de endotelina y bradicidina, entre otros (Figura 1).

Extracelular

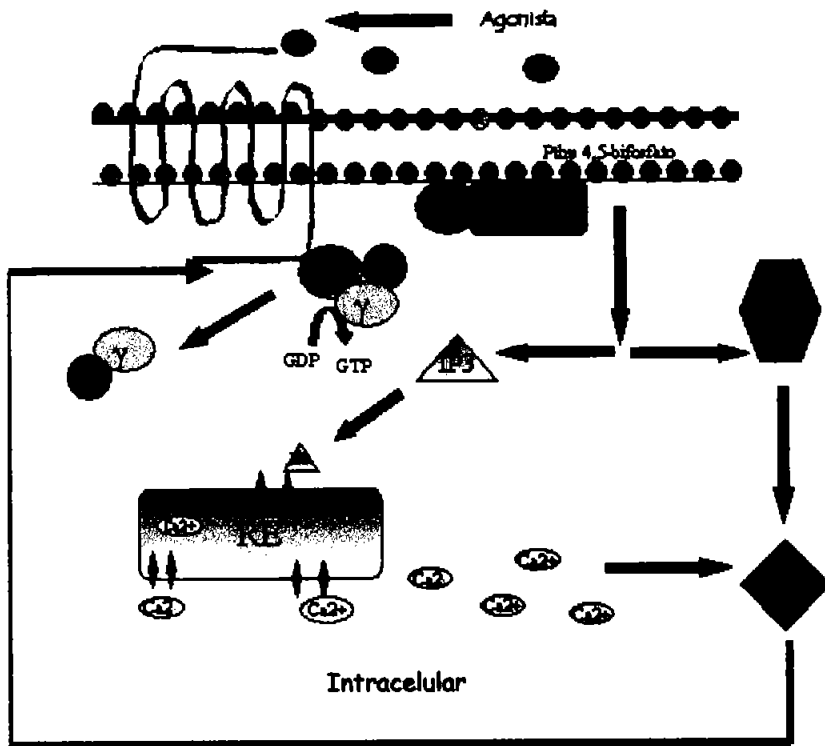


Figura 1. Vía de señalización del sistema de fosfoinosítidos-calcio. Norepinefrina (NE), Difosfato de Guanidina (GDP), Trifosfato de Guanidina (GTP), Fosfolipasa C β (PLC β), Inositol Trifosfato (IP3), Diacil Glicerol (DAG), Retículo Endoplasmático (RE), ión Calcio (Ca^{2+}), Proteína Kinasa C (PKC).

Vía de la Adenilil Ciclasa.

En esta vía los receptores β -adrenérgicos y α_2 -adrenérgicos que actúan a través de las proteínas G_s y G_i , respectivamente, provocan la estimulación o la inhibición de una enzima asociada a membrana denominada adenilil ciclasa (AC), la cual es encargada de sintetizar adenosina de monofosfato cíclico (AMPc) a través de la hidrólisis de ATP, la cual mediante un cambio conformacional activa a una proteína cinasa dependiente de AMPc, denominada PKA. Esta enzima se compone de dos subunidades catalíticas y dos reguladoras que se separan al activarse la enzima, las subunidades catalíticas pueden fosforilar a otras proteínas en residuos de serina y treonina, como a la fosforilasa b cinasa, la cual activa a la glucógeno fosforilasa b, lo que conduce a la rápida movilización de glucosa a partir de glucógeno (Figura 2).

Extracelular

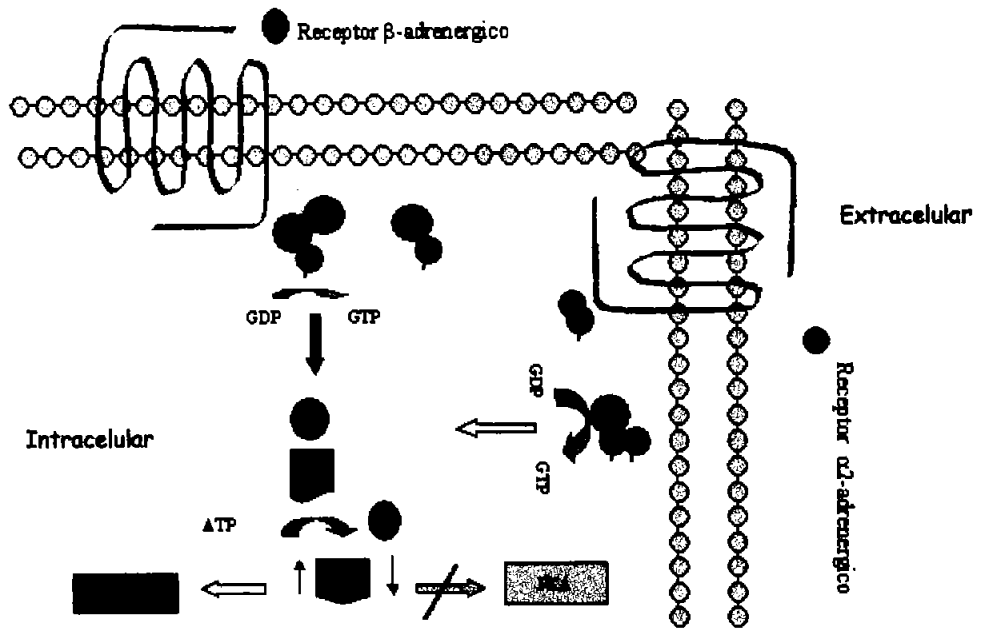


FIGURA 2. Vía de señalización de la Adenilil Ciclasa. Norepinefrina (NE), Difosfato de Guanidina (GDP), Trifosfato de Guanidina GTP), Adenilil Ciclasa (AC), Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc), Adenosina Trifosfato (ATP), Proteína Cinasa A (PKA)

Receptores Adrenérgicos:

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, y son las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina, sus ligandos naturales. Como ya se mencionó se caracterizan estructuralmente por presentar un extremo amino terminal extracelular, con siete segmentos de 20 a 25 residuos de aminoácidos hidrofóbicos que forman los dominios transmembranales, conectados por tres asas extracelulares y tres intracelulares y un extremo carboxilo terminal intracelular. El sitio de unión al agonista se encuentra localizado dentro de los dominios transmembranal, mientras que las regiones citosólicas intervienen en el acoplamiento con las proteínas G. Gracias a estudios realizados, utilizando mutagénesis dirigida, ha sido posible conocer los aminoácidos y los sitios específicos de unión al ligando; el modelo estructural más aceptado indica que las asas III, IV, V y VI forman un dominio de unión al ligando y que el residuo 113 de aspartato actúa como contra-ión para contrarrestar la carga de la epinefrina y que así pueda existir una unión no covalente entre el receptor y su agonista. Otro sitio de unión muy importante es el que interactúa con las proteínas G, el cual se localiza en la II y III asas intracelulares.

Existen tres subfamilias de receptores adrenérgicos, los α_1 , α_2 y los β , de los cuales se han identificado nueve subtipos en total, esto es: α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) y β (β_1 , β_2 , β_3). Estos receptores difieren en sus secuencias de

aminoácidos, en la afinidad por sus diferentes agonistas y en las vías de transducción que activan (García-Sáinz, 2000).

Los subtipos de receptores α_1 adrenérgicos que se han clonado son el α_{1A} , el α_{1B} , y el α_{1D} , los cuales son capaces de activar la vía de recambio de fosfoinosítidos- Ca^{2+} , aunque con diferencias en la eficiencia para producir la respuesta intracelular, siendo los más eficientes los α_{1A} seguidos por los α_{1B} y α_{1D} , respectivamente (Coge, et al, 1999) (Figura 3).

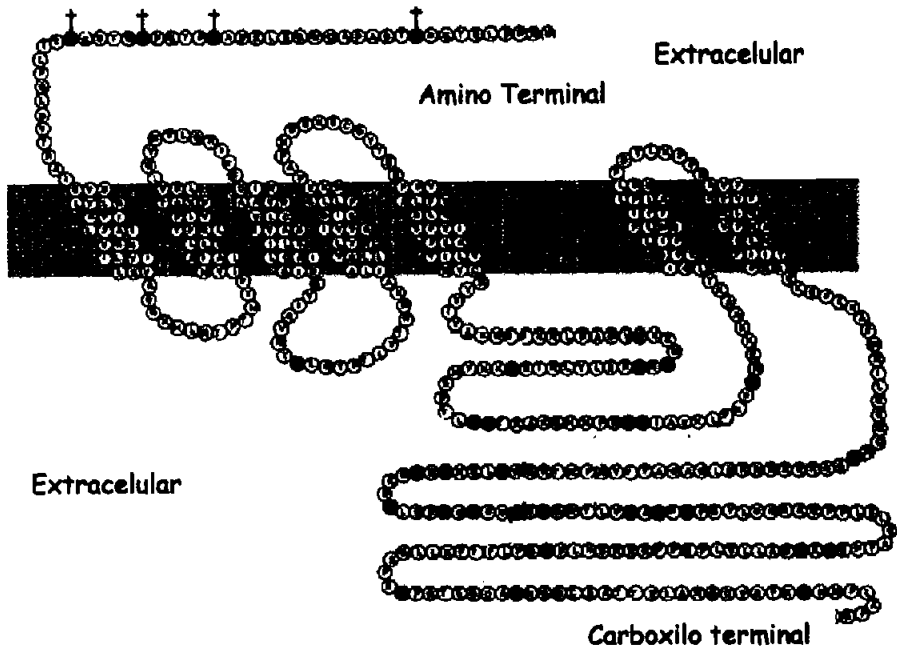


FIGURA 3. Modelo estructural del receptor α_{1b} , en donde se muestra la secuencia de aminoácidos, los sitios de dominios transmembranales los sitios de glicosilación (●), el sitio de reconocimiento a *Gaq* (●), y los sitios de fosforilación a PKC (●), a GRK (●) (Tomado de Cotecchia, et al., 1997).

Síntesis y metabolismo de catecolaminas

Las catecolaminas norepinefrina y epinefrina son los principales agonistas de los receptores adrenérgicos al promover su activación. La norepinefrina es sintetizada por neuronas simpáticas que se localizan en diversos núcleos como el locus coeruleus, o en el sistema límbico del cerebro. La epinefrina se sintetiza y almacena principalmente en las glándulas suprarrenales. Estas dos moléculas son los principales agentes adrenérgicos naturales comportándose como neurotransmisores y hormonas, respectivamente (Siegel, 1999).

La síntesis de ambos compuestos consiste en la descarboxilación e hidroxilación del aminoácido esencial tirosina, el cual se adquiere mediante la alimentación o de la conversión hepática de la fenilalanina. Estas reacciones enzimáticas ocurren en el citoplasma celular, en donde la tirosina es hidroxilada a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa, la cual necesita de la co-enzima 5, 6, 7,8 tetrahidrobiopterina para poder actuar. En el siguiente paso la L-DOPA es descarboxilada por una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos convirtiéndose en dopamina, la cual es hidroxilada para producir norepinefrina. La norepinefrina entonces es metilada en su grupo amino por la enzima S-adenosilmetiltransferasa produciéndose la epinefrina (Figura 4) (Siegel, 1999). Después de sintetizarse, la adrenalina es secretada de la glándula suprarrenal para entrar a la circulación sanguínea donde afecta al sistema nervioso autónomo y actúa como mediador de varios procesos fisiológicos

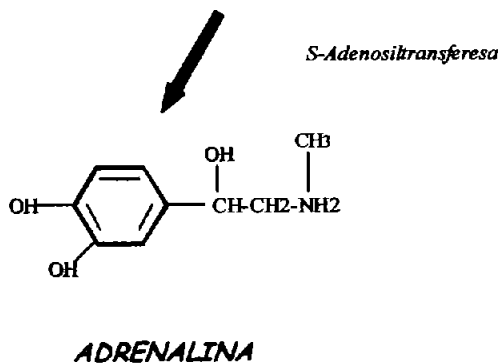
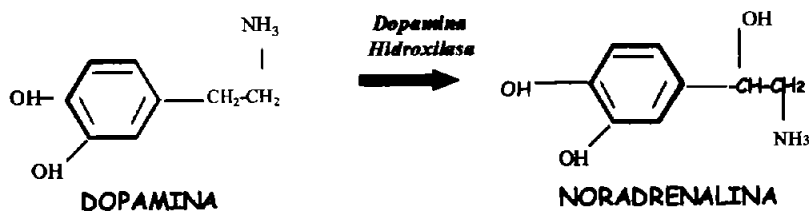
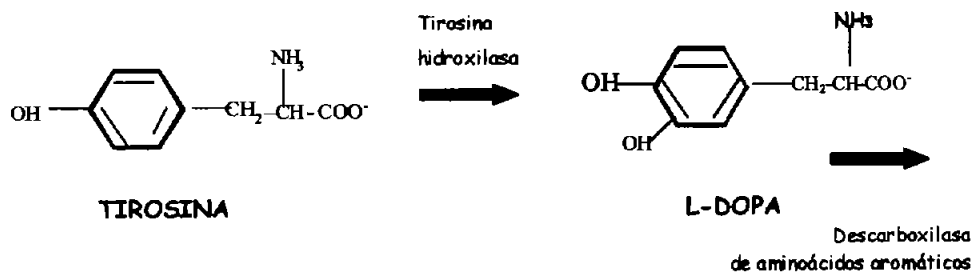


Figura 4. Síntesis de las catecolaminas noradrenalina y adrenalina a partir del aminoácido tirosina.

La liberación de estas hormonas al torrente sanguíneo o a los espacios presinápticos se lleva a cabo por la despolarización ocasionada por la entrada de iones al citoplasma, en donde se encuentran endocitadas la epinefrina y norepinefrina. El Ca^{2+} también promueve la síntesis de norepinefrina ya que activa a la cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CAM-II), la cual fosforila y activa a la tirosina hidroxilasa. La acción de estas hormonas termina por su recaptura a través de diversos transportadores, particularmente presinápticos; La degradación se lleva a cabo mediante reacciones enzimáticas una vez que las hormonas son recapturadas por la enzima monoamino oxidasa (Siegel, 1999).

Importancia fisiológica de los receptores α_1 adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos se encuentran expresados en la mayoría de las células del cuerpo humano, gracias a estudios realizados para la detección de RNA mensajeros y por hibridación in situ e inmunohistoquímica, se ha podido demostrar que existe una localización diferencial de cada uno de los subtipos en diferentes tejidos y órganos, incluyendo el cerebro, las arterias, el hígado, la próstata y el bazo (García-Sáinz, et al., 2000).

También existe una diversidad de los receptores adrenérgicos entre diferentes especies, por ejemplo, en el hígado humano se expresa el mRNA del subtipo α_{1A} , (García-Sáinz et al. 1995) y en el hígado de rata al subtipo α_{1B} (Rokosh, 1994).

En el humano el subtipo α_{1A} , es predominante en el corazón, la corteza cerebral y la próstata (Pierce, et al; 1994). Los músculos lisos y los vasos deferentes expresan los subtipos α_{1B} y α_{1A} , respectivamente (Piasick, et al; 1999). El RNAm del subtipo α_{1B} se encuentra expresado en altas concentraciones en el bazo y en el riñón (García-Sáinz, 1999).

Los receptores α_1 adrenérgicos participan en una gran cantidad de procesos fisiológicos muy importantes como la regulación del equilibrio hídrico y de electrolitos, la contracción uterina, la regulación del ritmo cardíaco, la neurotransmisión a nivel central y periférico, el tono vascular, la contracción del músculo liso en el sistema genito-urinario y la modulación del metabolismo hepático, entre otras (García-Sáinz, et al; 2000).

Los receptores adrenérgicos, al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, activan respuestas mitogénicas y transcripcionales en varios tipos celulares, participando en procesos del desarrollo, como en la regulación del crecimiento, la diferenciación y la proliferación celular (Minemman, 1999).

Regulación de la actividad de los receptores α_1 adrenérgicos.

La modulación de la función de los GPCRs ocurre a través de dos procesos conocidos como desensibilización y resensibilización, los cuales son mecanismos de control que permiten a las células adaptarse ante los estímulos que reciben. La desensibilización se define como la disminución de la función de los receptores (Benovic, et; al, 1998).

Actualmente se conocen dos tipos de desensibilización: la homóloga, que se caracteriza por una disminución en la respuesta del receptor cuando ha sido estimulado por su propio agonista, y la heteróloga, que ocurre cuando la disminución de la respuesta es debida a la activación de otro tipo de receptor (Benovic, et; al 1998). En la desensibilización homóloga están involucrados una serie de procesos importantes: 1) el desacoplamiento rápido del receptor de la proteína G (segundos-minutos), como consecuencia de la fosforilación del receptor sin que haya una pérdida del número de receptores en la membrana; 2) el secuestro (internalización) del receptor en vesículas intracelulares en donde permanece por lo que no existe contacto con su agonista y 3) la regulación negativa ("down-regulation"), que sucede después de la estimulación prolongada por el agonista (horas) y en la que se presenta una disminución en la cantidad total de los receptores, debido a la reducción en su síntesis o al aumento en su degradación (Ferguson et al., 1996).

Se ha reportado que el proceso de desensibilización en el receptor α_{1B} -adrenérgico se lleva a cabo mediante la interacción directa con el complejo adaptador 2, a través de la unión de la subunidad μ_2 a un motivo de argininas del carboxilo terminal del receptor, (Cotecchia, et al., 2003), en cambio, en el receptor β -adrenérgico esta proteína adaptadora participa en la endocitosis del receptor a través de la unión con las β -arrestinas, formando vesículas de clatrina (Cotecchia, et al., 2003).

En la desensibilización homóloga, la fosforilación del receptor es un proceso muy importante e involucra a cinasas de residuos de serina y treonina, tales como la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA) y a las cinasas de los receptores acopladas a proteínas G (GRKs) (Ferguson et al., 1996). Estas cinasas fosforilan aminoácidos específicos en el extremo carboxilo terminal del receptor α_1 adrenérgico. Se han identificado seis miembros de las GRKs, llamados: GRK1 o rodopsina cinasa, GRK2 o cinasa 1 del receptor β -adrenérgico (β ARK1), GRK3 o β ARK2, GRK4, GRK5 y GRK6 (Pitcher et., al 1998), las cuales tienen la capacidad de reconocer y fosforilar a los receptores en su conformación activa (ocupado por su agonista) interviniendo sólo en la desensibilización homóloga (Pitcher et al, 1998).

La fosforilación del receptor por las GRKs ocasiona su desacoplamiento de la proteína G y permite la asociación del receptor con una familia de proteínas reguladoras conocidas como β -arrestinas (Benovic, et al; 1986).

Las β -arrestinas permiten la interacción del receptor con proteínas de membrana llamadas clatrininas, llevándose a cabo la internalización del receptor (Ferguson et al., 1996). Posteriormente, para su reciclamiento y reesensibilización participan una serie de fosfatasa que interactúan con los receptores vesicularizados para desfosforilarlos intracelularmente y que de esta manera regresen a la membrana plasmática o bien sean degradados en los lisosomas (Zhan, et al; 1997).

En la desensibilización heteróloga de los receptores α_1 adrenérgicos, participan la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA), mediante la regulación cruzada ("cross-talk") con otros receptores, provocando una disminución de la respuesta (Benovic et al, 1985). Una de las principales evidencias de dicho proceso de desensibilización, se reportó en hepatocitos de rata, en donde al activar a la PKC con ésteres de forbol se observó una inhibición en la funcionalidad de los receptores α_1 adrenérgicos, asociándose este fenómeno con la fosforilación del receptor (Corvera, et al., 1986). Un resultado similar se encontró estudiando la línea celular DDT1MF2, en donde se demostró también la fosforilación del receptor α_{1B} adrenérgico inducida por ésteres de forbol (TPA) (Leeb-Lunderg, et al, 1985).

Los estudios de la secuencia del receptor α_{1B} adrenérgico han permitido conocer que existen sitios consenso para la fosforilación por la PKC (Lattion, et al., 1994). La activación de la PKC induce la fosforilación y la desensibilización de diferentes receptores, como los receptores para angiotensina AT1 (García-Caballero, et al.

2001), los receptores AT_2 (Olivares Reyes, et al., 2000), además de los receptores α_{1A} , α_{1B} , y α_{1D} -adrenérgicos (Vázquez-Prado et al., 2000; García-Sáinz, et al., 1999; García-Sáinz, et al., 2000).

Otra enzima que participa en la desensibilización heteróloga es la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), que participa de manera importante en la regulación cruzada del receptor α_{1B} -adrenérgico, al activar el mecanismo que conduce a la fosforilación y desensibilización del receptor. Esta familia de estas enzimas promueve también la activación de otras vías de señalización para factores de crecimiento y citocinas. La PI3K cataliza la reacción de fosforilación del OH en la posición 3' del anillo de inositol del lípido fosfatidilinositol, como son el fosfatidil inositol 4-5-bisfosfato y el fosfatidil inositol, 3,4,5-trifosfato los cuales actúan como importantes segundos mensajeros al activar de manera directa o indirecta a diferentes proteínas cinasas, como por ejemplo a diferentes isoformas de la PKC y a la proteína cinasa B (PKB) (Cantley, 2002).

La fosforilación y desensibilización del receptor α_{1B} -adrenérgico, es inducida también por otros receptores acoplados a proteínas G, como el receptor de bradicidina (B2) (Medina, et al., 1998), el receptor de endotelina (ETA) (Vázquez-Prado et al., 1997) y el del ácido lisofosfatídico (LPA) (Casas-González et al., 2000). Así como por receptores con actividad de cinasa de serina/treonina como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), (Romero-Ávila, et al., 2003) y por receptores con actividad de cinasa de tirosina, como el del factor de

crecimiento epidérmico (EGF) y el del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Medina, et al., 1998).

RECEPTORES CON ACTIVIDAD DE CINASA DE TIROSINA

Los miembros representativos de los receptores con actividad de cinasa de tirosina son el receptor de insulina, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor derivado de plaquetas (PDGF) y los receptores de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I y II). Estos receptores tienen un solo dominio extracelular en el que se une el ligando, una región transmembranal y un dominio intracelular con actividad de cinasa de tirosina. La unión del ligando induce la dimerización de moléculas efectoras y la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina. Estas fosforilaciones crean distintos sitios de unión para diferentes proteínas con actividad enzimática, como pueden ser la fosfolipasa C gamma (PLC γ), la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), cinasas de tirosina de la familia Src y las fosfatasas de tirosina (SHP1 y SHP2), o para proteínas adaptadoras como Shc, Grb2, Crk, Nck, Cbl, y Gab1; interviene además en la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Ulrich, et.al., 1999).

RECEPTOR DE INSULINA (IR)

El objeto de estudio de este trabajo es la vía de señalización del receptor para insulina. Esta se inicia mediante la unión de la hormona a su receptor ubicado en la superficie celular (White, MF. 1997). El receptor de insulina es una glucoproteína transmembranal, compuesta por dos subunidades α las cuales tienen una masa molecular de 135 KDa y dos subunidades β de 95 KDa, las cuales están unidas mediante puentes disulfuro, formando un heterotetrámero α - α - β - β . En ausencia de la insulina, la subunidad α del receptor inhibe la actividad de cinasa de tirosina de la subunidad β (White, MF. 1997).

El comienzo de la vía de señalización del receptor de insulina inicia cuando la insulina se une a las cadenas α del receptor, lo que promueve la actividad de cinasa de tirosina de las cadenas β y cada monómero $\alpha\beta$ fosforila residuos críticos de tirosina cerca del extremo carboxilo de la cadena β . Esta autofosforilación permite al receptor fosforilar residuos de tirosina de otras proteínas diana (Khan J.E. 2001).

Una de estas proteínas diana es el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), el cual una vez fosforilado en sus residuos de tirosina, pasa a ser el sustrato de activación de otras proteínas que transportan el mensaje desde el receptor hasta el citosol y el núcleo, a través de una serie de proteínas intermediarias.

Como paso inicial un residuo de tirosina fosforilado del IRS-1 es unido por el dominio SH2 (las secuencias de los dominios SH2 son similares a un dominio de

otra proteína tirosina), de la proteína Grb2, la cual a su vez recluta a otra proteína Sos, esta unión cataliza la sustitución del GDP unido por GTP en Ras, la cual es una proteína G monomérica, cuando el GTP está unido, Ras puede activar a una proteína cinasa denominada Raf-1; una vez activada esta fosforila a MEK y a MAPK que forman una cascada en la que cada cinasa activa a la siguiente por fosforilación. La proteína activada por mitógenos (MAPK), se activa por fosforilación de un residuo de tirosina y otro de treonina, la cual activa, interviene en algunos de los efectos biológicos de la insulina al entrar al núcleo y fosforilar proteínas tales como Elk1, que modula la transcripción de determinados genes regulados por la insulina (Cheatham and Kahn, 1995).

El IRS-1 activa por fosforilación a otra proteína la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) a través de dominios de SH2 de esta última. Una vez activa la PI3K convierte el lípido de membrana fosfatidil inositol 4,4-bisfosfato (PIP2) en 3,4,5-trisfosfato (PIP3) el cual activa directamente a la proteína cinasa B. A continuación PKB fosforila residuos de serina y/o tirosina de la cinasa glucógeno sintetasa 3 (GSK3), inactivándola y disminuyendo la síntesis de glicógeno.

La PKB desencadena también el desplazamiento de los transportadores de glucosa (GLUT-4) desde vesículas internas a la membrana plasmática estimulando la captación de glucosa desde la sangre (Khan J.E. 2001) (Figura 5).

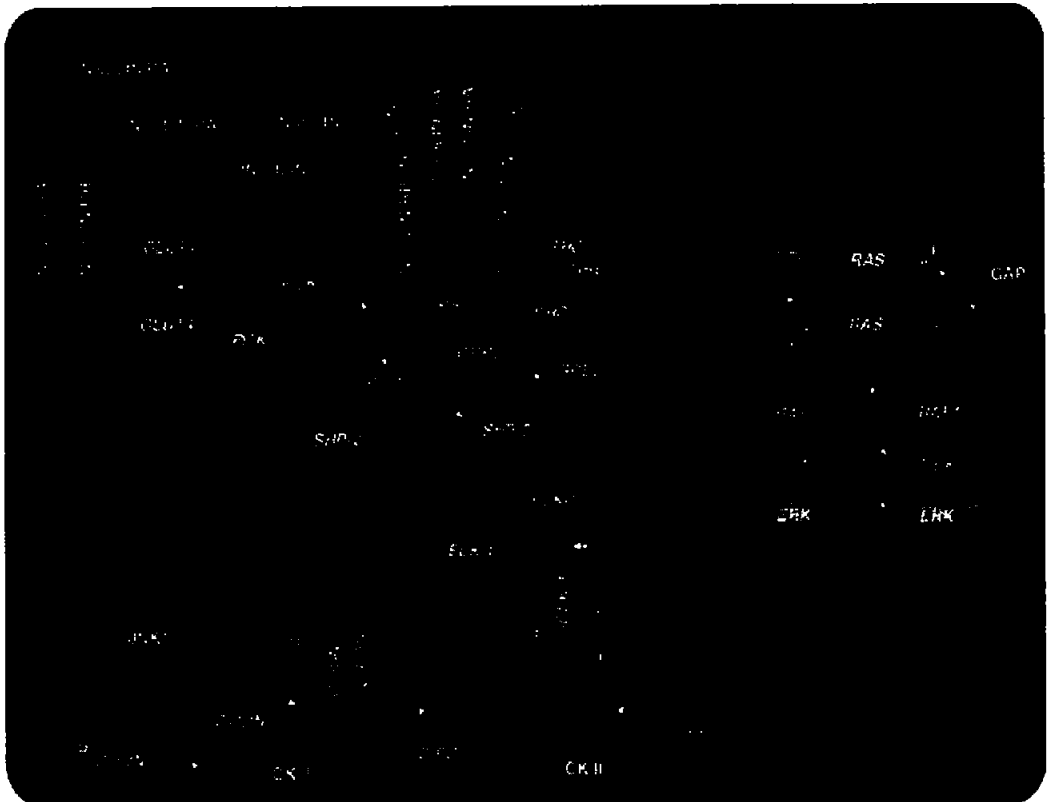


Figura 5. Vía de señalización del receptor de insulina. La insulina activa a su receptor, encendiendo su actividad enzimática de cinasas de tirosina, el cual fosforila a su sustrato (IRS-1), fosforilando a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y al complejo Grb2-Sos (Growth factor receptor-bound protein 2- Son of sevenless protein) el cual activa la vía de las MAPK cinasas (Mitogen-activated protein kinases).

INSULINA

La insulina se encarga de regular la concentración de glucosa en sangre, favorece la síntesis de lípidos, la utilización y almacenamiento de nutrientes celulares como aminoácidos y ácidos grasos, además promueve bloqueo de procesos catabólicos como la degradación del glucógeno, grasas y proteínas (Khan A.H. 2001).

La insulina es producida y secretada por las células beta del páncreas, la cual es sintetizada primero como una cadena precursora de 110 aminoácidos llamada preinsulina. Esta molécula precursora es translocada a la membrana plasmática a través del retículo endoplasmático rugoso en donde es cortada y transportada en vesículas hacia el complejo de Golgi, allí es empaquetada en gránulos para su conversión en insulina con la ayuda de dos endopeptidasas dependientes de calcio (PC2 y PC3), posteriormente, la insulina es liberada a la circulación sanguínea en cantidades equimolares (Goodman & Gillman, 2001).

La glucosa es el principal estímulo para la producción de insulina, esta se lleva a cabo cuando ésta entra a las células β mediante transporte facilitado mediado por transportador específico de glucosa, GLUT4. Los transportadores de glucosa son glucoproteínas de membrana, con una masa molecular de aproximadamente 50 kDa y cada uno posee 12 dominios helicoidales que abarcan la membrana. Una vez dentro, el azúcar es fosforilado por una enzima llamada glucocinasa, esta reacción promueve la conversión de ATP en ADP, lo que promueve una inhibición de los canales de K^+ sensibles a ATP, provocando la despolarización de las células β . De

manera compensatoria se activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje permitiendo la entrada de Ca^{2+} hacia la célula. El Ca^{2+} activa a las fosfolipasas A_2 y C lo que estimula a la formación de ácido araquidónico, fosfatos de inositol y diacilglicerol. El inositol 1,4,5 trifosfato moviliza Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático; lo que ayuda a aumentar las concentraciones de Ca^{2+} dentro de las células finalizando la secreción de insulina. La insulina una vez secretada circula en el torrente sanguíneo como un monómero libre, teniendo una vida media en plasma de unos cinco a seis minutos; desintegrándose principalmente en hígado, riñones y músculo. La desintegración proteolítica de la insulina en el hígado ocurre después de la internalización de ésta con su receptor dentro de vesículas pequeñas denominadas endosomas, y en menor grado en la superficie celular (Goodman & Gillman, 2001).

ANTECEDENTES

Es conocido que la insulina antagoniza la acción de los receptores α_1 -adrenérgicos en hepatocitos de rata, alterando la concentración de calcio en el citosol y activando a la sintetasa y fosforilasa del glucógeno (Thomas., 1985). Ha sido bien caracterizado en nuestro laboratorio que en el hígado de rata se lleva a cabo un antagonismo de la insulina y de las catecolaminas, y que estas acciones metabólicas pueden estar mediadas a través de los receptores α_{1B} -adrenérgicos (García-Sáinz y Hernández Sotomayor, 1985., García Sáinz et al., 1986).

Los receptores α_{1B} -adrenérgicos, participan en una gran cantidad de eventos celulares, y son regulados por fosforilación y desensibilización. Este mecanismo de desensibilización ha sido sujeto de estudio ya que en él participan diferentes procesos de regulación cruzada con receptores acoplados a proteínas Gq/11 como el receptor de ET_A y los receptores de bradicidina que son capaces de regular al receptor α_{1B} adrenérgico a través de la activación de la PKC; los receptores para LPA que se acoplan a G_i (Casas-González et., al 2000) y de algunos receptores con actividad de cinasa de tirosina como el de EGF y el de PDGF, (Medina et., al 2000) y receptores con actividad de cinasa de serina/treonina como el TGF- β (Romero-Ávila, et al, 2002), en donde participan la PI3K y la PKC .

Se ha reportado que la activación de los receptores de insulina lleva a cabo la fosforilación y desensibilización del receptor β_2 -adrenérgico, a través de la vía de señalización del receptor de insulina, el cual presenta actividad de cinasa de

tirosina; participando en esta el sustrato IRS-1, la fosfatidil inositol 3 cinasa y la proteína cinasa B (PKB/Akt) (Malbon, et al., 1998).

Con base en estos antecedentes se estudió si el receptor de insulina es capaz de regular el estado de fosforilación y desensibilizar al receptor α_{1B} -adrenérgico, además de la posible participación de otras cinasas en esta vía.

HIPÓTESIS

Si la activación de los receptores de insulina llevan a un incremento en el estado de fosforilación y desensibilización del receptor α_{1B} -adrenérgico, entonces estarán participando ambos receptores en un mecanismo de regulación cruzada.

OBJETIVOS

Generales:

- ❖ El objetivo de este trabajo es conocer si los receptores de insulina modulan al receptor α_{1B} -adrenérgico por fosforilación y si esto causa una desensibilización en la línea celular DDT1MF2 y Rat-1 α_{1B} .

Particulares:

- ❖ Conocer el papel de los receptores de insulina en la regulación por fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, en ambas líneas celulares.
- ❖ Identificar la participación de las proteínas cinasas involucradas en el proceso de fosforilación inducida por insulina.
- ❖ Estudiar si se presenta desensibilización del receptor α_{1B} -adrenérgico inducido por la insulina, mediante estudios funcionales, como son la producción de fosfatos de inositol y la determinación de $[Ca^{2+}]_i$.

MATERIALES Y MÉTODOS

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 insulina, el propranolol, y los reactivos de uso general fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. El LY 294002, wortmanina, estaurosporina y bisindoleilmaleimida fueron de Calbiochem. El [32 P]Pi (8500-9120 Ci/mMol); el [2, 3- 3 H]-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.

Cultivos celulares

La línea celular Rat-1 (fibroblastos de pulmón de rata) que expresan por transfección estable a el receptor α_{1B} -adrenérgico de hámster, además de expresar endógenamente los receptores para insulina, fueron donados por el grupo del los Dres. R. J. Lefkowitz y M. G. Caron (Duke University Medical Center). Las células DDT1MF2 (músculo liso de hámster) expresan endógenamente el receptor α_{1B} -adrenérgico y al receptor de insulina (CRL-1701, ATTC). Ambas líneas fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO/BRL) con glutamina y con una concentración de glucosa alta. Fue

complementado con 10% suero fetal de bovino (SFB, GIBCO/BRL), antibióticos: estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 U/ml, anfotericina B 0.25 $\mu\text{g/ml}$ y G418 300 $\mu\text{g/ml}$ como antibiótico de selección. Las células DDT1MF2 fueron cultivadas en condiciones similares a las Rat-1, solo que el medio no contenía el antibiótico de selección G418. Las células fueron cultivadas dentro de una incubadora a 37 °C en una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂.

Fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico

Las células DDT1MF2 y las células Rat-1 que expresan el receptor α_{1B} adrenérgico fueron crecidas en placas de cultivo de 6 pozos a confluencia, dejando en ayuno sin suero un día antes. El día del experimento las células fueron mantenidas en medio DMEM libre de fosfatos por 1 hora y después se incubaron con 2 ml de este mismo medio conteniendo [³²P]Pi (50 $\mu\text{Ci/ml}$ para las Rat-1 α_{1B}) y (150 μCi para las DDT1 MF2), durante 3 horas a 37 °C. Las células así marcadas metabólicamente se estimularon con insulina o con algún otro agente como se indica en cada experimento. Posteriormente se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos-salino (PBS) fría y se resuspendieron en 500 μl de solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; SDS 0.1%; tritón 1%; NaF 50 mM; Na₃VO₄ 100 μM ; β -glicerofosfato 10mM; Na₄P₂O₇ 10mM; p-Serina 1mM; p-Tirosina 1mM; 1mM p-Treonina 1mM; EDTA 5mM; leupeptina 20 $\mu\text{g/ml}$; aprotinina 20 $\mu\text{g/ml}$, fluoruro de fenil-sulfonilo (PMSF) 100 $\mu\text{g/ml}$ y de

inhibidor de tripsina de soya 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a pH 7.5 final) por una hora sobre hielo. Los extractos fueron colectados y centrifugados a 10,000 x g o 13,000 rpm por 15 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Los sobrenadantes de las muestras fueron transferidos a tubos nuevos, que contenían 5 μl del antisuero generado contra el receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico y se le adicionaron además 20 μl de proteína A-agarosa. Se incubaron toda la noche a 4°C; posteriormente, 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 %, SDS 5 % a pH 7.2 (solución de lavado). A las esferas lavadas se les agregó solución de Laemmli y fueron sometidas a ebullición durante cinco minutos. Se centrifugaron, y los sobrenadantes de las muestras fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % en condiciones reductoras.

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

Medición de [Ca²⁺]

Al estar en confluencia las células DDT1MF2 y las células Rat-1 α_{1B} , se incubaron toda la noche con medio DMEM sin suero ni antibióticos en cajas petri. Al día siguiente las células fueron cargadas con el fluoróforo FURA 2AM [$5\mu\text{M}$] en una solución de 5 ml de medio Krebs-Ringer-Hepes-Glucosa (NaCl 120 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, KCl 4.75 mM, glucosa 10 mM, Hepes 20mM, CaCl_2 1.27 mM, albúmina sérica bovina 0.05%, pH 7.4) con 0.05% de albúmina de suero bovino a pH 7.4 durante 45 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 .

Después de la incubación se lavaron tres veces con solución fisiológica amortiguadora para eliminar la albúmina y el FURA 2AM externo, a continuación las células fueron despegadas de la caja con 0.5 ml de tripsina al 0.5% durante 1 minuto, pasado este tiempo fueron resuspendidas en medio Krebs-Hepes-Glucosa-BSA sin CaCl_2 y trasladadas a tubos cónicos de 15 ml para realizar 3 lavados, éstos consistieron en centrifugar 5 min a 3000 rpm, en donde se descarto el sobrenadante y el botón celular se resuspendió muy suave en 10 ml de Krebs-Hepes-Glucosa. En el último lavado las células fueron resuspendidas en el mismo medio pero complementado con CaCl_2 1.3 mM.

Una vez hecho esto, las células fueron preincubadas en presencia de insulina 100 nM y propranolol 10 μM , en las células DDT1MF2, ya que estas expresan receptores β -adrenérgicos, durante 15 min a temperatura ambiente en agitación

suave. Las células Rat1- α_{1B} solo fueron preincubadas con insulina 100 nM en las mismas condiciones.

La movilización de calcio intracelular se observó después de la estimulación con diferentes concentraciones de norepinefrina, mediante cambios en la fluorescencia. Las células se mantuvieron en agitación constante y se utilizó un espectrofotómetro - fluorómetro AMINCO-Bowman serie 2, el cual registra la fluorescencia de excitación a 340 nm y a una emisión de 510 nm del fluoróforo.

La $[Ca^{2+}]_i$ se cuantificó utilizando un programa de computo incluido en el espectrofluorómetro a partir de la relación entre la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo a la ecuación $[Ca^{2+}]_i = K_d [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] [Sf2/Sb2]$, donde la K_d representa la constante de afinidad del fluoróforo por el Ca^{2+} ; R es la lectura de la fluorescencia en unidades arbitrarias, R_{min} representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar el quelante de Ca^{2+} EGTA (5mM) y R_{max} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Tritón-X-100 al 1%. $Sf2$ y $Sb2$ son los coeficientes de proporcionalidad del fluoróforo libre ($Sf2$) y el unido al calcio ($Sb2$) en la longitud de onda 2 (Grynkiewicz, et al., 1998).

Cuantificación de fosfatos de inositol totales

Las líneas celulares DDTIMF2 y Rat1- α_{1B} fueron sembradas en placas de seis pozos con medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos-antimicóticos, dejando que llegaran a una confluencia del 90%.

Marcando metabólicamente con él [2,3-³H]mio-inositol 5 μ Ci/ml por 18 horas en DMEM sin inositol. El día del experimento se retiró el medio radiactivo y las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), después las células fueron incubadas con una solución de Krebs-Ringer-Hepes-LiCl (NaCl 120 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, Hepes 20 mM, CaCl₂ 1.27 mM, 20 mM pH 7.4), durante 20 min a 37°C. Posteriormente se preincubaron las células con insulina 100nM y propranolol 10 μ M, dependiendo de la línea celular. Pasado este tiempo las células fueron estimuladas con norepinefrina 10 μ M durante 5 minutos. La estimulación fue detenida aspirando el medio y agregando 2ml de cloroformo: metanol (2:1) en frío dejando incubar en hielo durante 20 minutos, pasado este tiempo se recupera el lisado de las placas y se transfiere a tubos de ensaye agregando 0.7 ml de cloroformo mezclando con el vortex y 0.7 ml de agua llevando a cabo el mismo procedimiento, después se centrifugaron 10 minutos a 3000rpm en una centrífuga clínica. Tomando la fase acuosa para separar los fosfatos de inositol totales (IPs), se eluyó con una solución de 0.1M de ácido fórmico, y 1 M de formato de amonio por cromatografía de intercambio aniónico en columnas de Dowex AG1-X8.

Las cuentas por minuto (CPM) de las fracciones colectadas se obtuvieron en un contador de centelleo Beckman, analizando los datos en el programa Prisma 2.0 Graph pad.

Resultados

Al estimular el receptor de insulina se induce la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico.

Los estudios de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico inducidos por la estimulación de los receptores de insulina con insulina 100nM durante 15 minutos, muestran que el receptor es fosforilado en ambas líneas celulares utilizadas en este estudio.

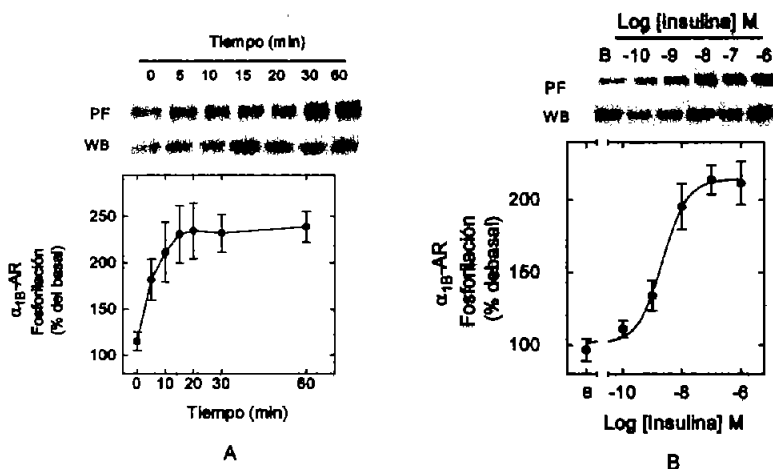


Figura 6. Efecto de la insulina sobre la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico. Panel A. Curso-temporal de células Rat-1 α_{1B} que expresan transfectado establemente al receptor α_{1B} -adrenérgico y de forma endógena al receptor de insulina fueron marcadas metabólicamente con [32 P] Pi durante 3 horas a 37° C e incubadas con los tiempos que se muestran con insulina 100 nM. Panel B. Dosis-respuesta en las células Rat-1 α_{1B} que expresan transfectado establemente al receptor α_{1B} -adrenérgico y endógenamente al receptor de insulina, fueron marcadas con [32 P] Pi durante 3 horas a 37° C e incubadas con insulina a las concentraciones indicadas en la gráfica. Se presenta una autorradiografía representativa de la proteína fosforilada y de Western Blot de la cantidad de proteína total del receptor. Las líneas verticales en la grafica representan la S.E.M. de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones de células.

En la figura 6 (panel A), se muestra el curso-temporal de la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico estimulada por insulina en las células Rat-1 α_{1B} . En ella se observa que la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, aumenta rápidamente entre los 10 y 15 minutos de estar en contacto con la hormona, manteniéndose así hasta los 60 minutos. En el panel B de la figura se presenta la curva dosis-respuesta de las células Rat-1 α_{1B} , en donde se muestra que la insulina induce dependiente de la concentración un incremento de ≈ 2 veces en el estado de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, las cuales fueron estimuladas con insulina por 15 minutos observándose el efecto máximo de fosforilación con la concentración de 100 nM de insulina.

En la figura 7, (panel A) se muestra la cinética curso-temporal de las células DDT1MF2, en donde el estado de fosforilación mayor del receptor fue a los 15 minutos del estímulo, disminuyendo hacia los 30 minutos de exposición con la hormona. En el panel B la dosis-respuesta muestra que la concentración máxima a la cual la insulina es capaz de inducir la fosforilación del receptor es de 100 nM, al igual que en las células Rat-1 α_{1B} .

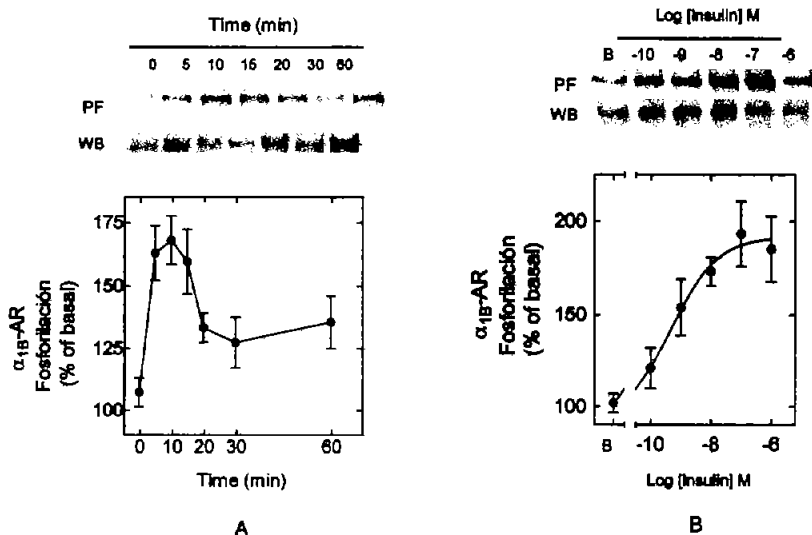


Figura 7. Panel A. Curva curso-temporal de la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico en células DDT1MF2 que expresan endógenamente al receptor α_{1B} -adrenérgico y al receptor de insulina, fueron marcadas con $[^{32}P]$ Pi durante 3 horas a $37^{\circ}C$ e incubadas con insulina 100nM en los tiempos indicados y con 10 μ M de propranolol durante 15 minutos. Panel B. Curva dosis respuesta de la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico en células DDT1MF2 que expresan establemente al receptor α_{1B} -adrenérgico al receptor de insulina fueron marcadas metabólicamente con $[^{32}P]$ Pi durante 3 horas a $37^{\circ}C$ e incubadas con las concentraciones de insulina indicadas en la gráfica durante 15 minutos. Se presenta una autorradiografía representativa de la proteína fosforilada y del Western Blot de la proteína total del receptor α_{1B} -adrenérgico inmunoprecipitado. Las líneas verticales en la grafica representan la S.E.M. de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones de células

La PKC y PI3K participan en la vía de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico.

Conociendo que el receptor adrenérgico es fosforilado por la activación de los receptores de insulina, se llevaron a cabo experimentos para conocer las posibles proteínas involucradas en este mecanismo de regulación cruzada; con base en antecedentes de trabajos realizados en el laboratorio, en los cuales se demuestra la presencia de dos proteínas cinasas, la PKC y PI3K que intervienen en la regulación cruzada del receptor α_{1B} -adrenérgico con receptores que presentan actividad de cinasa de tirosina, como el receptor del factor crecimiento epidérmico (EGF) y el del derivado de plaquetas (PDGF) (Medina 2000). Se llevaron a cabo experimentos de fosforilación del receptor en ambas líneas celulares utilizando inhibidores de estas cinasas.

Para inhibir a la PI3K, se usó 100nM de wortmanina y 1 μ M de LY 294002; para inhibir a la PKC se usaron 1 μ M de bisindoleilmaleimida I o 100 nM de estaurosporina.

Como se aprecia en la figura 8, el uso de estos inhibidores bloqueó en forma muy similar la fosforilación del receptor inducida por insulina, en las células Rat α_{1B} (Panel A) y en las células DDT1MF2 (panel B). Estos datos sugieren la participación de estas enzimas en la vía de regulación cruzada entre ambos receptores ya que, como se menciono anteriormente la PI3K activa a la PKC, y esta proteína fosforila al receptor adrenérgico. Es probable que la activación de

la PKC ocurra a través de una interacción directa con el PI(3,4)P2 y el PI(3,4,5)P3, generados por la PI3K. Existe otra cinasa importante en la vía de señalización de receptores con actividad de cinasa de tirosina, la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositidos (PDK-1), la cual también puede intervenir en el control de la PKC, ya que se une con alta afinidad al PI(3,4,5)P3 (Chow, 1998, Schlessinger & Ullrich, 1992).

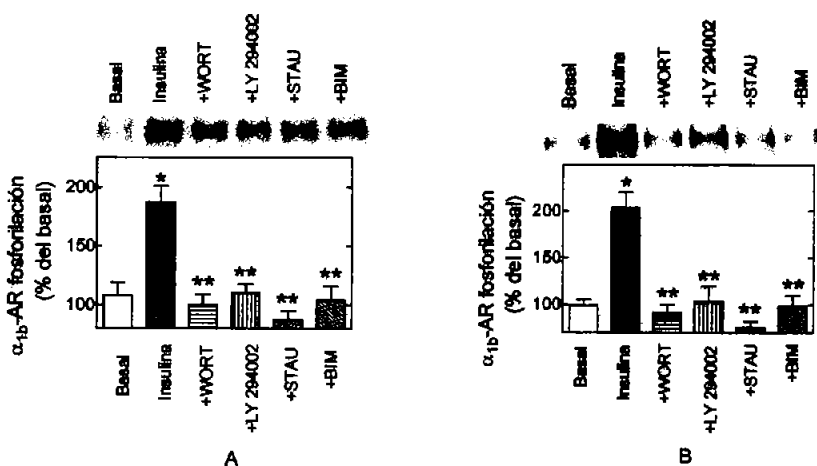


Figura 8. Efecto de inhibidores de la proteína cinasa C (PKC) y de la fosfatidilinositol 3 cinasa sobre la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico Inducida por la activación de receptores de insulina. Panel A. Células Rat-1 que expresan transfectados establemente al receptor α_{1B} -adrenérgico y de forma endógena al receptor de insulina fueron marcadas metabólicamente con [32 P]Pi durante 3 horas a 37° C, las cuales fueron preincubadas durante 30 minutos con los inhibidores, wortmanina (100 nM), LY 294002 (1 μ M), estaurosporina (100 nM) y bisindoleilmaleimida I (1 μ M) y después estimulados 15 minutos con insulina (100 nM). Panel B. Células DDT1MF2 que expresan endógenamente al receptor α_{1B} -adrenérgico y al receptor de insulina, fueron marcadas con [32 P]Pi durante 3 horas a 37° C, y preincubadas durante 30 minutos con los inhibidores wortmanina (100 nM), LY 294002 (1 μ M), estaurosporina (100 nM) y bisindoleilmaleimida I (1 μ M) y estimuladas 15 minutos con insulina (100 nM) + propranolol (10 μ M) y solo propranolol (10 μ M). Se presenta una autorradiografía representativa. Las líneas verticales en la grafica representan la S.E.M. de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones de células. *p < 0.001 vs basal **p < 0.001 vs insulina

Una vez establecida el mecanismo y la cinética de fosforilación del receptor α_{1B} adrenérgico, inducida por los receptores de insulina se prosiguió con la realización de experimentos de cuantificación de fosfatos de inositol y determinación de la movilización de $[Ca^{2+}]_i$, inducidos por norepinefrina (Figura 9); para saber si la activación de los receptores de insulina tienen algún papel en la respuesta fisiológica del receptor α_{1B} -adrenérgico, desensibilizándolo, en las líneas celulares estudiadas.

El efecto de norepinefrina $10 \mu M$ en las células Rat- $1\alpha_{1B}$ (panel A) no muestra una disminución en la producción de fosfatos de inositol totales al estar preincubadas 15 minutos con insulina $100 nM$. En las células DDT1MF2, (panel B) se muestra una disminución del 60% en la producción de fosfatos de inositol totales, al estar preincubados 15 minutos con insulina $100 nM$, en comparación con las células que en donde no se aprecia una disminución de la respuesta. Lo que sugiere que el receptor α_{1B} -adrenérgico, es desensibilizado por la activación de los receptores de insulina solo en la línea celular DDT1MF2.

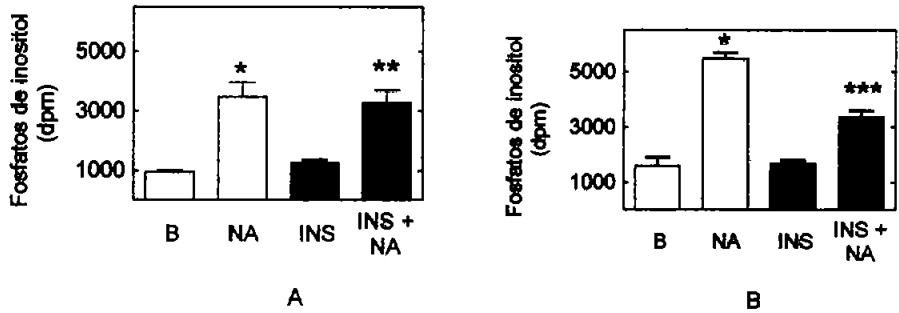


Figura 9. Efecto de insulina sobre la producción de fosfatos de inositol totales inducidos por norepinefrina. Panel A. Células Rat-1 marcadas toda la noche con [³H]-mio-inositol en medio DMEM libre de inositoles, las cuales fueron preincubadas en ausencia o presencia de insulina 100 nM durante 15 minutos y estimuladas con norepinefrina 10 μM. Panel B. Células DDTIMF2 marcadas toda la noche con [³H]-mio-inositol en medio DMEM libre de fosfatos, al día siguiente fueron preincubadas con insulina (100 nM) + propranolol (10 μM) y propranolol (10 μM) durante 15 minutos y después estimuladas 5 minutos con norepinefrina (10 μM). Las líneas verticales en la grafica representan la S.E.M. de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones de células. *p < 0.001 vs basal **p < 0.001 vs insulina, ***p < 0.001 vs noradrenalina.

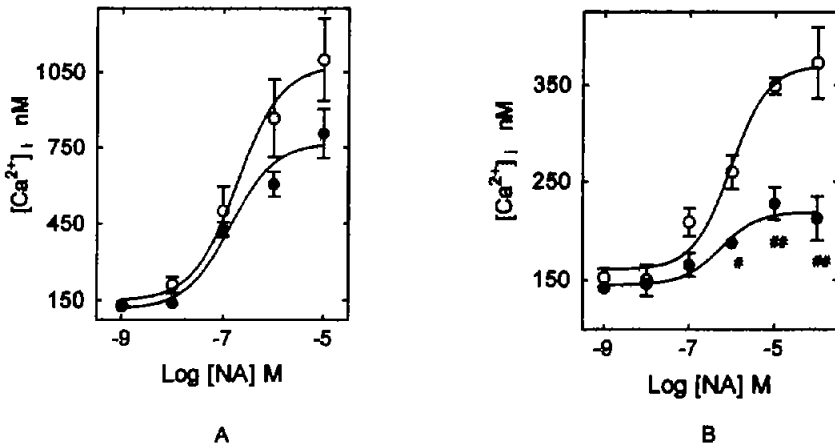


Figura 10. Efecto de insulina en la liberación de la $[Ca^{2+}]_i$ Inducido por norepinefrina
Panel A. Curva Dosis Respuesta de células Rat-1 α_{18} marcadas 30 minutos a 37 ° C con FURA 2 AM (5 μ M), las cuales fueron preincubadas en ausencia (○) o presencia (●) de insulina 100 nM durante 15 minutos y estimuladas con norepinefrina a las concentraciones indicadas en la grafica. **Panel B.** Curva Dosis Respuesta de células DDT1MF2 tratadas con FURA 2AM (5 μ M) durante 30 minutos a 37° C y preincubadas 15 minutos en ausencia (○) y presencia (●) de insulina 100 nM y propranolol 10 μ M, seguida por la estimulación con norepinefrina a las concentraciones mostradas en la grafica. Las líneas verticales en la grafica representan la S.E.M. de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones de células. *p < 0.05 vs norepinefrina, **p < 0.001 vs norepinefrina + insulina.

Los resultados obtenidos en la movilización de la $[Ca^{2+}]_i$, inducida por norepinefrina $10\mu M$ (Figura 10), en las células Rat-1, (panel A) muestran que la respuesta no fue disminuida al tratarse con insulina, lo cual sugiere que no se afecta de manera significativa la respuesta adrenérgica en esta línea celular.

En las células DDT1MF2, se aprecia una caída significativa del 40% en liberación de la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de insulina (100 nM), (panel B).

Estos resultados muestran que el efecto de desensibilización es diferente dependiendo la línea celular en donde se lleven a cabo los experimentos, ya que las células Rat-1 expresan una mayor densidad de receptores adrenérgicos transfectados (~ 120 pmoles/mg de proteína) (Vazquez-Prado; García-Sáinz, 1996), lo cual puede atenuar los efectos del receptor de insulina el cual se expresa de manera endógena en las células, por lo que no se aprecia el efecto de desensibilización. Por lo contrario las células DDT1MF2 los receptores α_{1B} -adrenérgicos se expresan endógenos, (~ 400 fmoles/mg de proteína), (Hague C, et. al, 2004), motivo quizá por el cual se aprecie una desensibilización en esta línea celular.

En la figura 11 se presenta el efecto de los inhibidores de la PKC (estaurosporina y bisindoleilmaleimida) y de la PI3K (wortmanina y LY294002) en la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$, confirmando la intervención de estas dos cinasas en el proceso de fosforilación y desensibilización del receptor α_{1B} -adrenérgico, ya que la respuesta de insulina fue abatida por los inhibidores, recuperándose la respuesta adrenérgica.

Los resultados obtenidos nos muestran una diferencia muy importante en las repuestas fisiológicas de ambas líneas celulares, ya que solo en las células DDT1MF2 fueron disminuidas las respuestas de la producción de fosfoinosítidos totales y la liberación de la $[Ca^{2+}]_i$; esto podría deberse, probablemente a la cantidad de receptores expresados en las líneas celulares, ya que el modelo de estudio de la línea celular DDT1MF2 es endógeno y en la línea celular Rat-1 α_{1B} , los receptores adrenérgicos expresados en transfección estable. De forma interesante en ambas líneas celulares el receptor α_{1B} -adrenérgico fue fosforilado, con la misma dosis máxima de insulina (100 nM), pero con diferencias en el curso-temporal.

Estos resultados aportan información acerca de las interacciones que ocurren a nivel del receptor α_{1B} -adrenérgico, en coordinación con otro tipo de receptores, como es el caso del receptor de insulina, ya que nos ayuda a entender un poco mas

como la célula puede integrar información de una gran cantidad de eventos que involucran varias y diversas vías de señalización.

La información obtenida en este trabajo revela que al ser activados los receptores de insulina se produce un aumento en la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, llevándose a cabo su desensibilización, mediante un mecanismo de regulación cruzada entre estos receptores.

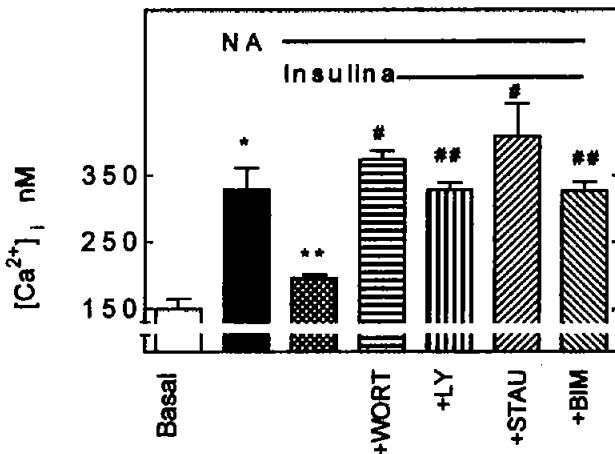


Figura 11. Efecto de los inhibidores de la PKC y de la PI3K en la liberación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por norepinefrina

Las células DDT1MF2 fueron marcadas con FURA 2AM (5 μ M), por 30 minutos a 37°C, las cuales fueron pretratadas con los inhibidores wortmanina (100nM), LY 294002 (μ M), estaurosporina (100nM) y Bisindoleilmaleimida (1 μ M). Después fueron preincubadas 15 minutos con insulina 100 nM y propranolol (10 μ M), seguido con la estimulación de norepinefrina (10 μ M). Las líneas verticales en la grafica representan la S.E.M. de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones de células. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.001$ vs 10 μ M norepinefrina + 10 μ M de propranolol; # $p < 0.001$ vs 10 μ M norepinefrina + 10 μ M de propranolol + 100 nM insulina ; *** $p < 0.001$ vs 10 μ M norepinefrina + 10 μ M de propranolol + 100 nM insulina.

Discusión

Los datos presentados en este trabajo indican que la activación del receptor de insulina, incrementa el estado de fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico induciendo su desensibilización. La fosforilación y desensibilización del receptor α_{1B} adrenérgico han sido ampliamente estudiadas en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteínas Gq/11 como es el caso del receptor de endotelina (ET_A); (Vázquez-Prado, et al. 1998), receptores acoplados a proteínas Gi, como el receptor de ácido lisofosfatídico (LPA), (Casas-González, et al.2000) , receptores con actividad de serina treonina (TGF- β), (Romero-Ávila, 2003) y de algunos miembros de receptores con actividad de cinasa de tirosina, como es el caso del EGF y PDGF, (Medina et., la 2000)

El trabajo se llevó a cabo en dos líneas celulares, la línea celular Rat-1 α_{1B} , que expresa transfectados establemente a los receptores α_{1B} -adrenérgicos y endógenamente a los receptores de insulina, y la línea DDTIMF2, que expresa endógenamente ambos receptores.

En los resultados de esta tesis se muestra claramente que la activación de los receptores de insulina son capaces de modular la respuesta adrenérgica por fosforilación e inducir una desensibilización del receptor α_{1B} -adrenérgico en las células DDTIMF2.

El efecto en la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, fue observado en ambas líneas celulares, con una misma dosis máxima, pero con diferencias en el

estado temporal de la fosforilación, ya que la línea Rat- α_{1B} , se observa que la fosforilación permanece constante al cabo de 60 minutos de estimulación, por el contrario en las células DDT1MF2 este estado de fosforilación decrece hacia los 30 minutos de estímulo.

La fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, conlleva a un mecanismo de regulación, conocido como desensibilización, en el cual la respuesta del receptor es disminuida, este mecanismo puede ser monitoreado mediante ensayos fisiológicos como la producción de fosfatos de inositoles y por el incremento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$.

Los resultados obtenidos muestran de forma interesante la desensibilización del receptor α_{1B} -adrenérgico por los receptores de insulina, habiendo una disminución clara de IPs y de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$, inducida por la norepinefrina en las células DDT1MF2, mientras que en las células Rat- α_{1B} no fue observado este proceso.

Estas diferencias en los efectos del estado de fosforilación y funcionalidad del receptor, podrían proponer una diferencia en los procesos de señalización dependiendo del tipo celular y de la densidad de receptores expresados en éstas. La insulina induce la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico, mediante la participación de la PI3K y de la PKC, ya que se observa el bloqueo casi total de la fosforilación en presencia del inhibidor selectivo de la PI3K wortmanina y del inhibidor LY294002; o de los inhibidores de la PKC, estaurosporina y

bisindoleilmaleimida, lo cual sugiere claramente la participación de estas cinasas en la regulación del receptor α_{1B} -adrenérgico.

La fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico por PKC, ha sido bien caracterizada, ya que se ha demostrado que se lleva a cabo en residuos de serina específicos (Ser³⁹⁴ y Ser⁴⁰⁶), localizados en el carboxilo terminal del receptor α_{1B} -adrenérgico (Diviani, et al 1997). La PKC también induce la fosforilación del receptor α_{1A} -adrenérgico (Vázquez-Prado, et; al 2000), la del α_{1D} -adrenérgico (García-Sáinz, et; al 2001) y la de receptores no adrenérgicos como los receptores para angiotensina II (AT₁) (García-Caballero, et; al 2001) y los receptores de angiotensina (AT₂), (Olivares-Reyes, et; al 2000).

Se ha reportado que las células Rat-1 expresan cuatro isoformas diferentes de PKC ($\delta, \epsilon, \alpha, \xi$), en donde las isoformas α, δ y ϵ coinmunoprecipitan con el receptor α_{1B} -adrenérgico en condiciones basales o en condiciones de activación con norepinefrina, endotelina, ésteres de forbol o con hormonas que aumenten el estado de fosforilación del receptor. (Alcántara-Hernández et; al., 1998). Esto sugiere que alguna o varias de estas isoformas de la PKC estén participando en la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico a través de los receptores de insulina.

Es probable que la activación de la PKC ocurra por la interacción directa con el PI(3,4)P₂ y el PI(3,4,5)P₃ que son generados por la activación de la PI3K. Se ha

demostrado que estos fosfoinosítidos son capaces de activar a isoenzimas de PKC nuevas (δ, ϵ, η) y atípicas (λ, ξ). (Toker, et al. 1994)

Con la información obtenida en este trabajo de tesis se puede proponer un modelo para explicar los eventos moleculares que pueden llevar a cabo la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico a través de insulina, en donde este receptor lleva a cabo sus funciones con la capacidad de autofosforilación en residuos de tirosina que posee al ser estimulado con su agonista, se promueve la activación de su sustrato IRS-1, que mediante dominios de homología SH2 y SH3 se activa la PI3K. Una vez activada esta cinasa se generan PI(3,4)P2 y el PI(3,4,5)P3 los cuales activan a la PKC, que esta a su vez es capaz de catalizar la fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico. Figura 12.

Los resultados aportan información acerca de diferentes interacciones que ocurren a nivel del receptor α_{1B} -adrenérgico, ya que pueden ayudar a explicar la manera en la que la célula puede procesar e integrar la información que recibe de estímulos con diferentes agonistas, activando una gran cantidad de vías de señalización en donde pueden interaccionar diferentes tipos de receptores, dependiendo del estado fisiológico en el que la célula se encuentre y de las necesidades que ella requiera.

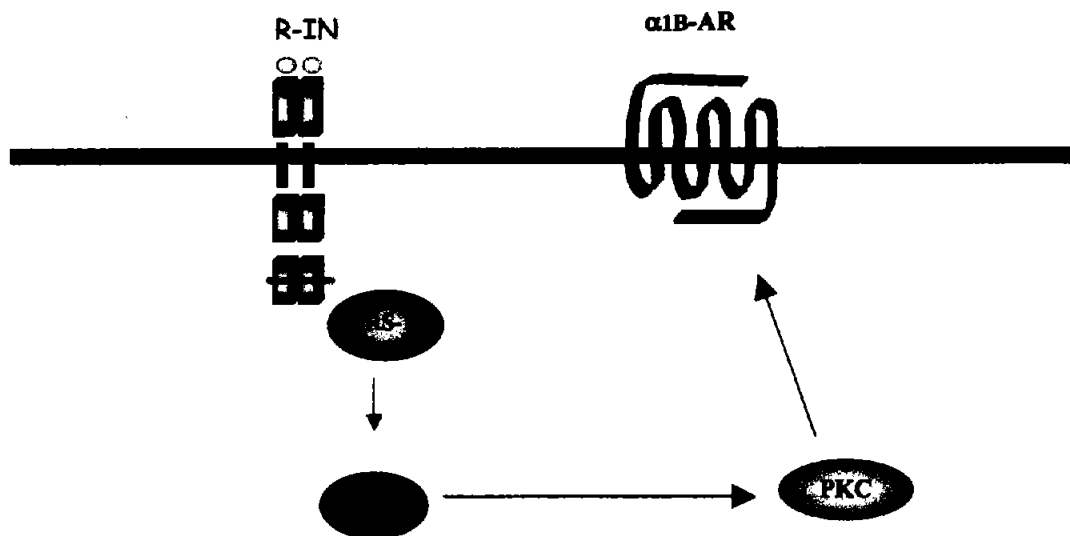


Figura 12. Modelo representativo del mecanismo de regulación cruzada del receptor α_{1B} -adrenérgico y el receptor de insulina. Receptor de insulina (RIN), sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), proteína cinasa C (PKC), receptor alfa 1B-adrenérgico (α_{1B} -AR).

Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado que los receptores de insulina promueven un incremento en el estado de fosforilación del receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico de manera dosis-dependiente con diferencias en el curso-temporal del estado de fosforilación del receptor, en las dos líneas celulares y la desensibilización solo fue reportada en las células DDT1MF2.

También se identificó la clara participación de la PI3K y de la PKC en la fosforilación del receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico a través del sustrato IRS-1 del receptor de insulina, lo que indica una participación de estas cinasas en este proceso.

BIBLIOGRAFIA

Alcántara-Hernández R, Leyva-Illades D, García-Sáinz JA. (2001). Protein kinase C- α (1B)-adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate. *Eur J Pharmacol.* May 4;419(1):9-13

Baltensperger K, Karoor V, Paul H, Ruoho A, Czech MP, Malbon CC. (1996). The beta-adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 12:271(2):1061-4.

Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. (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.* Jun 10;260(11):7094-101

Hague C, Uberti MA, Chen Z, Hall RA, Minneman KP. (2004). Cell surface expression of α 1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with α 1B-adrenergic receptors. *J. Biol Chem* 9;279(15):15541-9.

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.

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 α 1- and β 2- adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 262: 3106-3113.

Cogé, F;Guenn, SP; Renouard, A; Rique, H; Fabry, N; Beauverger, P; Nicolas, JP;Galizzi, JP; Boutin, JA and Canet ,E.(1999) Truncated isoforms inhibit [3H] prazosin binding and cellular trafficking of native human α 1A-adrenoceptors. *Biochem J.* 343:231-239

Cantley, L.C. (2002) The phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* 296:1655-1657

Casas-González, P., Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A. (2000) Lysophosphatidic acid modulates $\alpha 1\text{B}$ -adrenoceptor phosphorylation and function: Roles of G β and phosphoinositide 3-Kinase. *Mol. Pharmacol.* 57:1027-1033.

Corvera, S., García-Sáinz, J.A. (1984) Phorbol ester inhibit $\alpha 1$ -adrenergic regulation of hepatocyte m Chuang, T.T., Iacovelli, L., Salles, M., De Blasi, A. (1996) G Protein-Coupled receptors: Heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 416-421.

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 $\alpha 1\text{B}$ -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 $\alpha 1\text{B}$ -Adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 28712-28719.

Doronin S, Wang Hy HY, Malbon CC. (2002) Insulin stimulates phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor by the insulin receptor, creating a potent feedback inhibitor of its tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 22:277(12):10698-703. Epub

Eun-Mi Hur, Kyong-Tai Kim. (2002). G-protein coupled receptor signalling and cross-talk. Achieving rapidity and specificity. *Cellular signalling* 14; 397-405

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

García-Sáinz JA, Mendoza-Mendoza A, Vazquez-Prado J (1999) Intracellular calcium and $\alpha 1\text{B}$ -adrenoceptor phosphorylation. *Arch Med Res.*; 30(5):353-7.

García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R. (2001). Alpha adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res*;32(2):171

García-Sáinz JA, Vázquez-Cuevas FG, Romero-Avila MT. Phosphorylation and desensitization of alpha-1-adrenergic receptors. (2001). *Biochem J.* Feb 1; 353:603-10.

García-Sáinz JA, Tussie-Luna MI, Hernandez-Sotomayor SM (1986) Insulin-like effect of epidermal growth factor in isolated rat hepatocytes. Modulation of the alpha-1-adrenergic stimulation of ureagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 28: 889(2): 266-9.

García-Sáinz, JA and Hernandez-Sotomayor, MT.(1985) Adrenergic regulation of gluconeogenesis: posible involvement of two mechanisms of signal transduction in alpha-1-adrenergic action. *Proc. Natl. Acad.Sci.* Vol.82 6727-6730. *Biochemistry*

García-Sáinz JA, Vazquez-Prado J, del Carmen Medina L. (2000). Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharm.*11: 389(1) 1-12.

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 JA.(1995).Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. *Arch Med Res* 26:(3)205-12.

Goodman & Gilman's (2001) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill pp 2148

Haddock JR, Port JD, Gelman MS, Malbon CC. (1992) Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of beta 2-adrenergic receptors in response to insulin. *J Biol Chem.* 25:267(36):26017-22.

Ham, HE and Glichrist, A. (1996) Heterotrimeric G Proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 8:189-196.

Hur EM, Kim KT.G.(2002)Protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal.* May; 14(5): 397-405.

Khan, HA and Pessin, JE. (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia.* 45:1475-1483

Karoor V, Wang L, Wang HY, Malbon C(1998) Insulin stimulates sequestration of

beta-adrenergic receptors and enhanced association of beta-adrenergic receptors with Grb2 via tyrosine 350. *J Biol Chem.* 4:273(49):33035-41.

Klein U, Muller C, Chu P, Birnbaumer M, von Zastrow M. (2001) Heterologous inhibition of G protein-coupled receptor endocytosis mediated by receptor-specific trafficking of beta-arrestins. *J Biol Chem.* May 18; 276(20): 17442-7.

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

Luttrell, LM; Della Rocca, J; Van Biesen, T; Luttrell, DK; Lefkowitz, RJ. (1997) Role of c-Src tyrosine Kinase in G-protein coupled receptor and Gbeta-gamma subunit-mediated activation of mitogen activated protein Kinases. *J.Biol.Chem.* 27: 19443-19450

Malbon CC, Karoor V.G-protein-linked receptors as tyrosine kinase substrates: new paradigms in signal integration. *Cell Signal.* 1998;10(8):523-7.

Malbon CC. Heterotrimeric G-proteins and development. *Biochem Pharmacol.* 1997 10;53(1):1-4

Medina LC, Vazquez-Prado J, Torres-Padilla ME, Mendoza-Mendoza A, Cruz Munoz ME, Garcia-Sáinz JA.(1998) Crosstalk: phosphorylation of α_1B -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett.* 30: 422(2): 141-5.

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.

Minneman, K.P., Esbenshade, T.A. (1994) α 1-Adrenergic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 17-133.

Orci, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639-50.

Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G Proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell.* 80: 249-257

Orci, L. The Insulin Cells : It's Cellular Environment and how this Processes (pro) Insulin. *Diabetes Metab. Rev* 1996 71-106

Piasick, M.T., Hrometz, S.L., Edelman, S.E., Guarino, R.D., Hadley, R.W and Brown, R.D. (1997) Immunocytochemical localization of the alpha 1B adrenergic receptor and the contribution on this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction. *J Pharmacol Exp Ther.* 28:221-226.

Pierce KL, Premon RT and Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-Transmembrane receptors. *Nature reviews.* 3: 639-50

Pierce DT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Berkowitz D and Schwinn, DA. (1994) Localization of mRNA for three distinct alpha1-adrenergic receptors subtypes in human tissues: implications in human adrenergic physiology. *Mol Pharmacol.* 45:703.

Pitcher JA, Freedman, NJ and Lefkowitz, R.J. (1998). G-protein-coupled receptor kinases. *Ann.Rev. Biochem.*67:653-92

Pushpendran CK, Corvera S, Garcia-Sáinz JA. (1984) Effect of insulin on alpha1-adrenergic actions in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. Possible involvement of two pathways in alpha1-adrenergic actions. *Biochem Biophys Res Commun.* 30: 118(2): 451-9.

Rokosh, D.G; Bailey, B.A; Swtuar ; Long S; and Simposon P.C. (1994) Distribution of alpha1C-adrenergic receptors mRNA in adult rat tissues by Rnase protection assay and comparison with alpha 1B and 1D. *Biochem Biophys Res Commun.* 200:1177-1184

Romero-Ávila MT, Flores-Jasso CF, García-Sáinz, JA. (2002) Alpha1B-Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor-beta. *Biochem J. Dec 1; (368):* 581-7.

Shepherd, PR., Withers DL and Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-Kinase: the switch mechanism in insulin signalling. *Biochem.J.* 333, 471-490.

Sergey Doronin, Elena Shumay, Hsien-yu Wang, and Craig C. Malbon. (2002). Akt Mediates Sequestration of the

Siegel George (1999) *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Sixth Edition. Lippincott -Daven Publishers.

Susanne R. Keller and Gustav E. Lienhard (1994) Insulin signaling: the role of insulin receptor substrate 1, *Trends Cell Biol.* Apr; 4(4): 115-9. Pages 115-119

Thomas, A.P., Martín-Requero, A., Williamson, J.R., (1985) Interaction between insulin and alpha-1 adrenergics agents in the regulation of glycogen metabolism in isolated hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 260,5963-5973.

Ullrich, A, (1999) Review. G Protein Coupled Receptors. *Tips* 20-409

Vázquez-Prado J, García-Sainz JA. (1996). Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol.* Jul;50(1):17-22.

Vázquez-Prado, J, Medina LC, García-Sáinz JA.(1997) Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1B-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem.* 24;272(43):27330-7.

Vázquez-Prado, J, Casas-Gonzalez P, García-Sáinz JA (2003) G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal.* Jun;15(6):549-57.

Vázquez-Prado J, Medina LC, Romero-Ávila MT, González-Espinosa C, García-Sáinz JA.(2000) . Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha (1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *J Biol Chem.* 3; 275(9): 6553-9.

Vázquez-Prado J, García-Sainz JA. (1996). Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol.*;50(1):17-22.

Wang H, Doronin S, Malbon CC. (2000) Insulin activation of mitogen-activated protein kinases Erk1,2 is amplified via beta-adrenergic receptor expression and requires the integrity of the Tyr350 of the receptor. *J Biol Chem.*;275(46):36086-93.

Werry TD, Wilkinson GF, Willars GB. (2003) Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺. *Biochem J. Sep 1*; 374(2): 281-96.

White, M.F (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40:S2-S17

Zhang, J., F., Barak, L.S., Ménard,., Caron, M.G. Ferguson, S.S.G. L. (1997) A central role for beta-arrestin and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol. Chem.* 272:27005-27014.



Insulin induces α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation and desensitization

J. Adolfo García-Sáinz^{a,*}, M. Teresa Romero-Ávila^a,
Tzindilú Molina-Muñoz^a, Luz del Carmen Medina^b

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

^b*Departamento de Biología de la Reproducción, División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina, México, D. F. 09340, Mexico*

Received 16 January 2004; accepted 8 March 2004

Abstract

The ability of insulin to induce α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation and desensitization was tested in two model systems: rat-1 cells that stably express α_{1B} -adrenoceptors, through transfection, and endogenously express insulin receptors and DDT₁ MF2 cells that endogenously express both receptors. Insulin induced concentration-dependent increases in the phosphorylation state of the adrenergic receptors in the two models with similar EC₅₀ values (0.5–2 nM). The effect was rapid in the two systems but it was sustained in rat-1 cells and transient in DDT₁ MF2 cells. In both cell lines, the insulin-mediated phosphorylation of α_{1B} -adrenoceptors was blocked by wortmannin and LY 294002, and by staurosporine and bisindolylmaleimide I, indicating that the effect involved phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C activities. The adrenoceptor phosphorylation induced by insulin was associated to desensitization as evidences by a diminished elevation of intracellular calcium in response to noradrenaline. Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C blocked the functional desensitization induced by insulin.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Insulin; α_1 -adrenergic receptors; Receptor phosphorylation

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5603 and 04; fax: +52 55 5616 2282.

E-mail address: agarcia@ifisiol.unam.mx (J.A. García-Sáinz).

Introduction

It is well known that insulin counteracts many of the endocrine actions of catecholamines. In numerous tissues, the actions of catecholamines (β - and α_1 -adrenoceptor (AR)-mediated) are catabolic whereas those of insulin are anabolic (Cryer, 2003). Although great progress has been achieved, the mechanism(s) through which insulin attenuates the actions of catecholamines remains elusive and controversial.

Regarding insulin antagonism of β -adrenergic actions, it is known that insulin inhibits cyclic AMP accumulation by activating a low K_M cyclic AMP dependent phosphodiesterase (Marchmont and Houslay, 1980). It has also been reported that insulin inhibits adenylyl cyclase activity through stimulation of pertussis-toxin sensitive G-proteins (Heyworth and Houslay, 1983). The elegant work of Malbon and coworkers (Baltensperger et al., 1996; Doronin et al., 2002a; Doronin et al., 2002b; Hadcock et al., 1992; Karoor et al., 1995; Karoor et al., 1998), has shown that activation of insulin receptors leads to phosphorylation and desensitization of β_2 -ARs and that such action involves the insulin receptor kinase activity itself and a cascade including the insulin receptor substrates (IRS1, 2), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and the kinase Akt/PKB.

There is a large amount of information showing the ability of insulin to antagonize α_1 -adrenergic actions (Dehaye et al., 1981; García-Sáinz and Hernández-Sotomayor, 1985; Thomas et al., 1985), but little is known about the molecular mechanisms involved. Recent work from our laboratory has shown that activation of EGF receptors induces α_{1B} -AR phosphorylation and desensitization; such effects involve the sequential activation of the EGF receptor intrinsic kinase, PI3K and protein kinase C (PKC) (Medina et al., 2000). It is known that EGF shares some of the spectrum of insulin action and that it can antagonize α_1 -adrenergic actions (Bosch et al., 1986; García-Sáinz et al., 1986). PI3K is a key enzyme in the intracellular processing of the insulin and EGF signals (Cantley, 2002). Therefore, we tested whether insulin was able to induce α_{1B} -AR phosphorylation and affect α_{1B} -adrenergic actions. Two model systems were used: rat-1 cells that stably express α_{1B} -ARs, through transfection, and endogenously express insulin receptors and DDT₁ MF2 cells that endogenously express both. Our results clearly indicate that insulin is able to induce α_{1B} -AR phosphorylation in a pathway involving PI3K and PKC.

Materials and methods

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium, EGF, G418, fetal bovine serum and other reagents used for cell culture were obtained from Gibco BRL. (–) Noradrenaline, dl-propranolol, insulin, staurosporine, wortmannin and protease inhibitors were from Sigma Chemical Co. LY 294002, tyrphostin AG1478 and bisindolylmaleimide I were from Calbiochem. [³²P]P_i (8500–9120 Ci/mmol) and [2,3-³H]myo-inositol (22.9 Ci/mmol) were from Perkin Elmer Life Sciences. Fura-2 acetoxymethyl ester was from Molecular Probes. Protein A-Sepharose beads were from Upstate Biotechnology.

Cell culture

Rat-1 cells transfected with the hamster α_{1B} -AR (Cotecchia et al., 1988) were a generous gift from Drs. R.J. Lefkowitz, M.G. Caron and L. Allen. Cells were grown at confluence in 10-cm culture dishes

in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, G418 (300 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), penicillin (100 units/ml) and amphotericin B (0.25 µg/ml) under a 5% CO₂, 95% air atmosphere at 37 °C. DDT₁ MF-2 cells were obtained from American Type Culture Collection and cultured in the same medium but in the absence of G418. For all the experiments, confluent cells were serum-deprived overnight in unsupplemented Dulbecco's modified Eagle's medium.

Determination of α_{1B} -AR phosphorylation

Cells were incubated in phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium for 1 h, and then labeled in the same medium containing [³²P]_i (50 µCi/ml for rat-1 cells and 150 µCi/ml for DDT₁ MF2 cells) for 3 h at 37 °C, as described previously (Medina et al., 1998; Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). In this procedure, a rabbit antiserum against the carboxyl terminus decapeptide of the hamster α_{1B} -AR was used, which immunoprecipitates α_{1B} -ARs with high efficacy (~80% of photolabeled receptors) (Vázquez-Prado et al., 1997). In brief, following treatment with inhibitors and/or agonists, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed for 1 h on ice in 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 µM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerolphosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phosphoserine, 1 mM phosphothreonine and protease inhibitors (20 µg/ml leupeptin, 20 µg/ml aprotinin, 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 500 µg/ml bacitracin, 50 µg/ml soybean trypsin inhibitor). Cell lysates were centrifuged at 12,700 × 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 50 mM Hepes, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.05% SDS, 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-polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were dried and exposed for 24 h at -70 °C and the level of receptor phosphorylation was assessed using a Molecular Dynamics PhosphorImager and the Imagequant software. Western blotting using Super signal enhanced chemiluminescence kits from Pierce evidenced the level of receptor immunoprecipitated.

[Ca²⁺]_i measurements

Cells were incubated overnight in Dulbecco's modified Eagle's medium without serum and antibiotics and were loaded with 5 µM Fura-2 acetoxymethyl ester in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4 for 1 h at 37 °C. Cells were detached by gentle trypsinization and fluorescence measurements were carried out as described previously (Vázquez-Prado et al., 2000) with an Aminco-Bowman Series 2 Spectrometer with excitation monochromator set at 340 and 380 nm; a chopper interval of 0.5 sec was used, and the emission monochromator was set at 510 nm. [Ca²⁺]_i was calculated as described (Gryniewicz et al., 1985) using the software provided by Aminco-Bowman; traces were directly exported to the graphs.

[³H]inositol phosphate production

Cells were labeled with [³H]inositol (5 µCi/ml) for 18–24 h in inositol-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1% 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 thoroughly mixed and centrifuged in a clinical centrifuge. The aqueous phase was recovered and total [³H]inositol phosphates were separated by Dowex AG1-X8 chromatography (Berridge et al., 1983).

Statistical analysis between comparable groups was performed using ANOVA with Bonferroni's analysis and was effected with software included in the GraphPad Prism program.

Results

As shown in Fig. 1, in rat-1 cells insulin induced a concentration-dependent increase in the phosphorylation of α_{1B} -ARs, with a maximum of ≈ 2 -fold and an EC₅₀ of 2.0 ± 0.5 nM (mean \pm S.E.M., $n=8$). The effect of insulin was rapid reaching near maximal within 15 min and remaining at that level for at least 60 min. In DDT₁ MF-2 cells a clear effect was also observed but showed some differences. Firstly, the effect was consistently of lesser magnitude and transient, i. e., reached its maximum at 10–15 min rapidly decreasing to near basal values thereafter (Fig. 2). The transient nature of the effect was not due to receptor degradation as evidenced by Western blotting. The EC₅₀ observed in these cells was very similar (0.5 ± 0.25 nM; mean \pm S.E.M., $n=6$).

As mentioned, it is well known that PI3K is a key element in the signaling events triggered by the activation of the insulin receptor intrinsic tyrosine kinase (Cantley, 2002). Therefore, we next test the

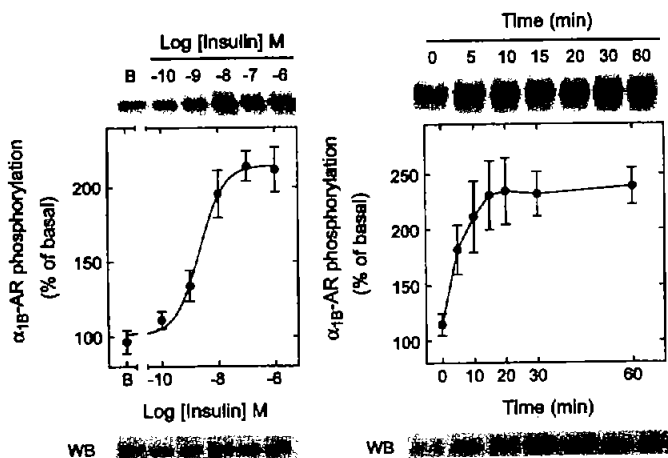


Fig. 1. Effect of insulin on α_{1B} -AR phosphorylation in rat-1 cells. Cells were incubated in the presence of the indicated concentration of insulin (*left panel*) for 15 min or with 100 nM insulin for the times indicated (*right panel*). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4–6 experiments using different cell preparations. Representative autoradiographs are presented. Western blots (WB) of the immunoprecipitated receptors are shown at the bottom of the figures.

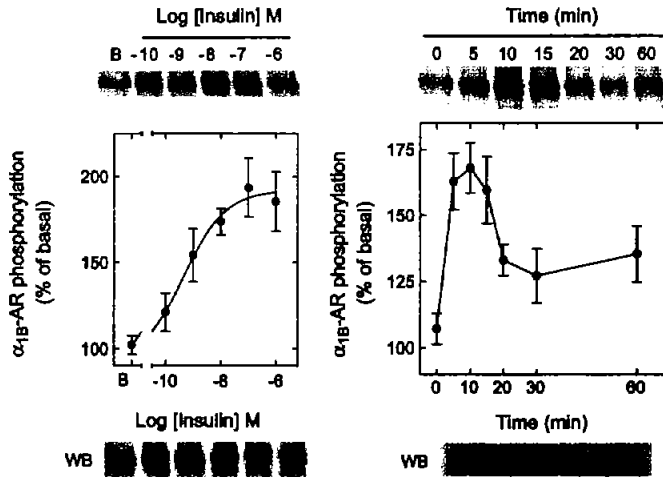


Fig. 2. Effect of insulin on α_{1B} -AR phosphorylation in DDT₁ MF-2 cells. Cells were incubated in the presence of the indicated concentration of insulin (*left panel*) for 15 min or with 100 nM insulin for the times indicated (*right panel*). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4–6 experiments using different cell preparations. Representative autoradiographs are presented. Western blots (WB) of the immunoprecipitated receptors are shown at the bottom of the figures.

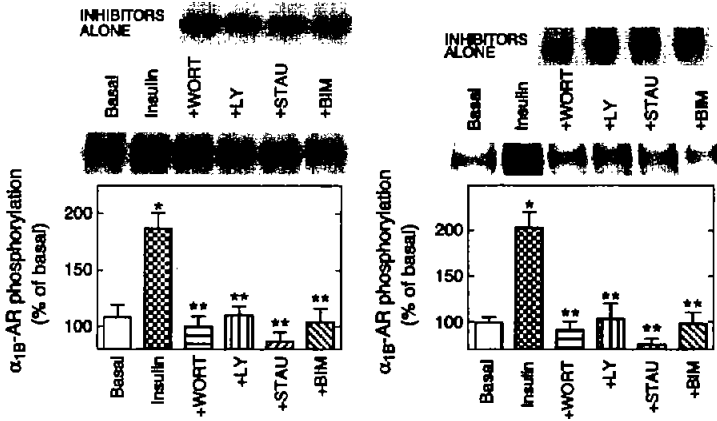


Fig. 3. Effect of kinase inhibitors on insulin-induced α_{1B} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts (*left panel*) or DDT₁ MF-2 cells (*right panel*) were incubated in the absence of any agent (Basal) or presence of 100 nM insulin alone (Insulin) or with 100 nM wortmannin (+WORT), 1 μ M LY 294002 (+LY), 100 nM staurosporine (+STAU) or 1 μ M bisindolylmaleimide I (+BIM). Incubations with insulin were for 15 min and inhibitors were added 30 min before insulin. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 7–9 experiments using different cell preparations. Representative autoradiographs are presented. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.001$ vs insulin alone.

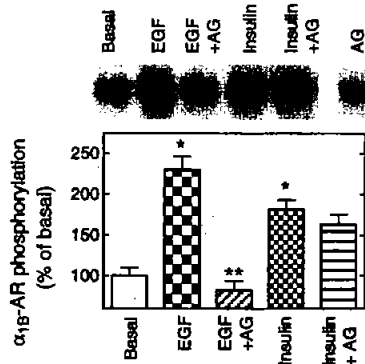


Fig. 4. Effect of EGF and insulin on α_{1B} -AR phosphorylation. Rat-1 fibroblasts were incubated in the absence of any agent (Basal) or presence of 100 ng/ml EGF or 100 nM insulin, alone or with 5 μ M AG1478 (AG). Incubations with insulin or EGF were for 15 min and AG1478 was added 30 min before. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5–6 experiments using different cell preparations. Representative autoradiographs are presented. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.001$ vs EGF alone.

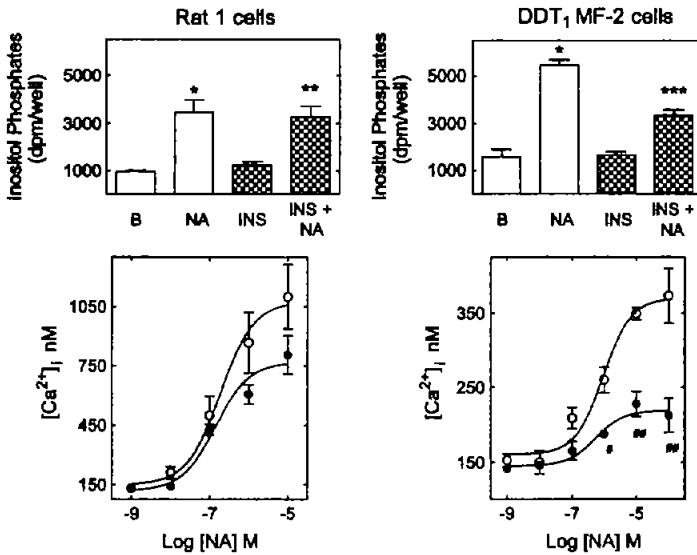


Fig. 5. Effect of insulin on α_{1B} -adrenergic action on intracellular calcium and [3 H]inositol phosphate production. Rat-1 fibroblasts (left panels) or DDT₁ MF-2 cells (right panels) were incubated as follows: (Upper panels) (B), without any agent; (NA) with 10 μ M noradrenaline +10 μ M propranolol, (INS) 100 nM insulin; (lower panels) with 10 μ M propranolol in the absence (open symbols) or presence of insulin (filled symbols) and the indicated concentration of noradrenaline (NA). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4–5 experiments using different cell preparations. * $p < 0.001$ vs basal, ** $p < 0.001$ vs insulin, *** $p < 0.01$ vs insulin and $p < 0.001$ vs noradrenaline; # $p < 0.05$ vs noradrenaline alone, ## $p < 0.001$ vs noradrenaline alone.

hypothesis that the action of insulin inducing α_{1B} -AR phosphorylation is mediated through PI3K by the use of inhibitors.

Wortmannin (100 nM) and LY 294002 (1 μ M) were used at concentrations selected on the basis of previously published work of our laboratory (Casas-González et al., 2003; Casas-González et al., 2000; Medina et al., 2000; Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). It should be mentioned that these inhibitors are selective and have different mechanisms of action. Wortmannin is a potent non-competitive inhibitor of PI3K (Powis et al., 1994), whereas LY 294002 competes at the binding site for ATP of this kinase (Vlahos et al., 1994); they were without effect on basal α_{1B} -AR phosphorylation but essentially abolished the effect of insulin (Fig. 3).

We next tested the effect of staurosporine and bisindolylmaleimide I, two structurally related inhibitors with selectivity for PKC (Toullec et al., 1991). At the concentrations tested (0.1–1 μ M) none of them significantly affected basal α_{1B} -AR phosphorylation but blocked the effect of insulin (Fig. 3).

The effect of EGF was compared to that of insulin. Both agents were able to increase α_{1B} -AR phosphorylation in rat-1 cells (Fig. 4). The effect of EGF, but not that of insulin, was blocked by tyrphostin AG1478 (Fig. 4).

In order to define if the phosphorylation of the α_{1B} -AR phosphorylation had functional consequences, we studied the effect of noradrenaline (in the presence of 10 μ M propranolol, to block any β -adrenergic effect) on the production of [3 H]inositol phosphates and the intracellular concentration of calcium. As shown in Fig. 5, noradrenaline increased the production of [3 H]inositol phosphates and the intracellular concentration of calcium in both cell lines. Interestingly, insulin clearly decreased both effects of noradrenaline in DDT₁ MF-2 cells but only marginally decreased noradrenaline-mediated increase in intracellular calcium in rat-1 cells.

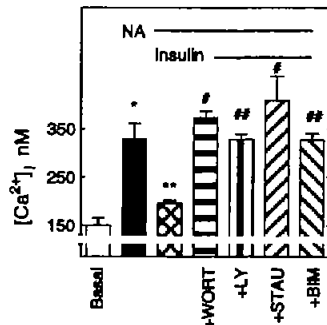


Fig. 6. Effect of kinase inhibitors on the action of insulin on α_{1B} -adrenergic-mediated increase in intracellular calcium. DDT₁ MF-2 cells were incubated in the absence of any agent or presence of 100 nM insulin or with 100 nM wortmannin (+WORT), 1 μ M LY 294002 (+LY), 100 nM staurosporine (+STAU) or 1 μ M bisindolylmaleimide I (+BIM). Incubations with insulin were for 15 min and inhibitors were added 30 min before insulin. At the end of such incubations 10 μ M noradrenaline +10 μ M propranolol (NA) were added and the increase in intracellular calcium recorded. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 6 experiments using different cell preparations. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.001$ vs 10 μ M noradrenaline +10 μ M propranolol; # $p < 0.001$ vs 10 μ M noradrenaline +10 μ M propranolol +100 nM insulin; ## $p < 0.01$ vs 10 μ M noradrenaline +10 μ M propranolol +100 nM insulin.

The ability of protein kinase inhibitors to block the action of insulin on the α_{1B} -adrenergic-mediated increase in intracellular calcium concentration was tested. It was observed that inhibitors of phosphoinositide 3-kinase and PKC blocked the action of insulin (Fig. 6). None of these agents affected basal calcium concentration or the action of noradrenaline (data not shown).

Discussion

Our present data show that insulin is capable of inhibiting α_{1B} -adrenergic action in two model systems, DDT₁ MF-2 cells and rat-1 fibroblasts. The data are interesting since they illustrate that there is no direct relationship between the magnitude of receptor phosphorylation and its functional consequences, i. e., insulin increased α_{1B} -AR phosphorylation in both cells and to a greater extent in the transfected rat-1 cell line but the metabolic consequences were much more evident in DDT₁ MF-2 cells endogenously expressing α_{1B} -ARs. It is possible that action(s) of insulin in addition to that at the α_{1B} -AR level may participate. In addition, the cellular context might be of importance, i. e., the metabolism of inositol phosphates and the relationship between IP₃ and intracellular calcium, among other factors may vary between different cell types.

Our present results indicate that PI3K is important not only for signaling but also for the cross talk with other receptors, as shown for the β_2 -AR (Baltensperger et al., 1996). Our data are similar to those obtained when EGF receptors are activated, involving PI3K and PKC (Medina et al., 2000); it is important to mention that the α_{1B} -AR phosphorylation induced by PDGF was not blocked by wortmannin which suggested that either PI3K is not involved or that several divergent signals could be generated by activation of PDGF receptors and might be in large excess (signal reserve) (Medina et al., 2000).

PI3K is a family of enzymes with fundamental roles in signaling and regulation of cellular activity comprising of catalytic and adaptor/regulatory subunits (Toker and Cantley, 1997; Wymann and Pirola, 1998). Class-1A PI3K is involved in the signaling of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, such as the insulin receptor; in this class the adaptor p85 subunit has SH2 and SH3 motifs that bind phosphotyrosine residues and the p110 catalytic subunit, respectively (Wymann and Pirola, 1998). PI3K is a modulator of PKC activity through the synthesis of 3-phosphorylated phosphoinositides. These phospholipids are important modulators of the phosphoinositide dependent protein kinase 1 (PKD-1) which phosphorylates the activation loop of some PKC isoforms (Le Good et al., 1998; Stephens et al., 1998); 3-phosphorylated phosphoinositides have also been reported to activate novel and atypical PKC isoforms (Stephens et al., 1998).

The complete blockade of the effect of insulin on α_{1B} -AR phosphorylation by inhibitors of PI3K and PKC suggests that these kinases act sequentially in a linear pathway. The most likely explanation suggests that activation of the insulin receptor kinase resulted in tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrates (IRS1, 2), which might lead to binding and activation of Class-1A PI3K. Stimulation of the phospholipid kinase activity resulted in activation of PKC, which then phosphorylated α_{1B} -ARs.

It is likely that the present finding may have physiological significance. The liver is an organ where the antagonism of insulin and catecholamines has been well characterized (Dehaye et al., 1981; García-Sáinz and Hernández-Sotomayor, 1985; Thomas et al., 1985) and where the metabolic actions of noradrenaline are mainly mediated through α_{1B} -ARs (García-Sáinz et al., 1992; Torres-Márquez et al.,

1991). Several groups have shown data consistent with the present findings. Using perfused rat liver, Dehaye et al. (Dehaye et al., 1981) showed that insulin markedly decreased the release of calcium into the perfusate induced by phenylephrine. Similarly, Thomas et al. (Thomas et al., 1985) showed, in isolated hepatocytes, that both the initial rate of free calcium increase and the magnitude of the effect induced by phenylephrine were markedly reduced in cells pretreated with insulin.

The ability of insulin to modulate the function of G protein-coupled receptors may be more widespread than anticipated and the mechanisms involved may also vary. In addition to the β_2 -AR (Baltensperger et al., 1996; Doronin et al., 2002a; Doronin et al., 2002b; Hadcock et al., 1992; Karoor et al., 1995; Karoor et al., 1998) and the α_{1B} -AR phosphorylation, presented here, it was recently shown that insulin signaling inhibits the actions of 5-HT_{2C} receptors in choroid plexus and *Xenopus* oocytes (Hurley et al., 2003). Surprisingly, this effect seems to involve receptor phosphorylation via MAP kinases (Hurley et al., 2003). Therefore, it is clear that the insulin receptor kinase can phosphorylate G protein coupled receptors and that downstream signaling can also result in phosphorylation involving, Akt/PKB (Doronin et al., 2002a), MAP kinases (Hurley et al., 2003) or, as shown here, PKC.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Drs. Lefkowitz, Caron and Allen for the Rat-1 cell line transfected with the hamster α_{1B} -adrenoceptor. This research was partially supported by Grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN206302) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (36230-N).

References

- Baltensperger, K., Karoor, V., Paul, H., Ruoho, A., Czech, M.P., Malbon, C.C., 1996. The beta-adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 1061–1064.
- Berridge, M.J., Dawson, R.M., Downes, C.P., Heslop, J.P., Irvine, R.F., 1983. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochemical Journal* 212, 473–482.
- Bosch, F., Bouscarel, B., Slaton, J., Blackmore, P.F., Exton, J.H., 1986. Epidermal growth factor mimics insulin effects in rat hepatocytes. *Biochemical Journal* 239, 523–530.
- Cantley, L.C., 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657.
- Casas-González, P., Ruiz-Martínez, A., García-Sáinz, J.A., 2003. Lysophosphatidic acid induces alpha-1b-adrenergic receptor phosphorylation through G-beta-gamma, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochimica Biophysica Acta* 1633, 75–83.
- Casas-González, P., Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A., 2000. Lysophosphatidic acid modulates alpha(1b)-adrenoceptor phosphorylation and function: roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase. *Molecular Pharmacology* 57, 1027–1033.
- Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randall, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Kobilka, B.K., 1988. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 85, 7159–7163.
- Cryer, P.E., 2003. Glucose homeostasis and hypoglycemia. In: Larsen, P.R., Kronenberg, H.M., Melmed S., Polonsky K.S. (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*. Elsevier Science, USA, pp. 1585–1618.
- Dehaye, J.P., Hughes, B.P., Blackmore, P.F., Exton, J.H., 1981. Insulin inhibition of alpha-adrenergic actions in liver. *Biochemical Journal* 194, 949–956.
- Doronin, S., Shumay, E., Wang, H.Y., Malbon, C.C., 2002a. Akt mediates sequestration of the beta(2)-adrenergic receptor in response to insulin. *Journal of Biological Chemistry* 277, 15124–15131.

- Doronin, S., Wang Hy, H.Y., Malbon, C.C., 2002b. Insulin stimulates phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor by the insulin receptor, creating a potent feedback inhibitor of its tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 10698–10703.
- García-Sáinz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M., 1985. Adrenergic regulation of gluconeogenesis: possible involvement of two mechanisms of signal transduction in alpha 1-adrenergic action. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 82, 6727–6730.
- García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T., Alcántara Hernández, R., Macías-Silva, M., Olivares-Reyes, A., González-Espinosa, C., 1992. Species heterogeneity of hepatic alpha 1-adrenoceptors: alpha 1A-, alpha 1B- and alpha 1C-subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186, 760–767.
- García-Sáinz, J.A., Tussie-Luna, M.I., Hernández-Sotomayor, S.M., 1986. Insulin-like effect of epidermal growth factor in isolated rat hepatocytes. Modulation of the alpha-1-adrenergic stimulation of ureagenesis. *Biochimica Biophysica Acta* 889, 266–269.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260, 3440–3450.
- Haddock, J.R., Port, J.D., Gelman, M.S., Malbon, C.C., 1992. Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of beta 2-adrenergic receptors in response to insulin. *Journal of Biological Chemistry* 267, 26017–26022.
- Heyworth, C.M., Houslay, M.D., 1983. Insulin exerts actions through a distinct species of guanine nucleotide regulatory protein: inhibition of adenylate cyclase. *Biochemical J* 214, 547–552.
- Hurley, J.H., Zhang, S., Bye, L.S., Marshall, M.S., DePaoli-Roach, A.A., Guan, K., Fox, A.P., Yu, L., 2003. Insulin signaling inhibits the 5-HT_{2C} receptor in choroid plexus via MAP kinase. *BMC Neuroscience* 4, 10.
- Karoor, V., Baltensperger, K., Paul, H., Czech, M.P., Malbon, C.C., 1995. Phosphorylation of tyrosyl residues 350/354 of the beta-adrenergic receptor is obligatory for counterregulatory effects of insulin. *Journal of Biological Chemistry* 270, 25305–25308.
- Karoor, V., Wang, L., Wang, H.Y., Malbon, C.C., 1998. Insulin stimulates sequestration of beta-adrenergic receptors and enhanced association of beta-adrenergic receptors with Grb2 via tyrosine 350. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33035–33041.
- Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P., Parker, P.J., 1998. Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042–2045.
- Marchmont, R.J., Houslay, M.D., 1980. Insulin trigger, cyclic AMP-dependent activation and phosphorylation of a plasma membrane cyclic AMP phosphodiesterase. *Nature* 286, 904–906.
- Medina, L.C., Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A., 2000. Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and alpha1b-adrenoceptors. *Biochemical J* 350, 413–419.
- Medina, L.C., Vázquez-Prado, J., Torres-Padilla, M.E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz Muñoz, M.E., García-Sáinz, J.A., 1998. Crosstalk: phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS letters* 422, 141–145.
- Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, 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 Research* 54, 2419–2423.
- Stevphens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T., 1998. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710–714.
- Thomas, A.P., Martín-Requero, A., Williamson, J.R., 1985. Interactions between insulin and alpha 1-adrenergic agents in the regulation of glycogen metabolism in isolated hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 260, 5963–5973.
- Toker, A., Cantley, L.C., 1997. Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387, 673–676.
- Torres-Márquez, M.E., Villalobos-Molina, R., García-Sáinz, J.A., 1991. Alpha 1-adrenoceptor subtypes in aorta (alpha 1A) and liver (alpha 1B). *European Journal of Pharmacology* 206, 199–202.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 266, 15771–15781.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., García-Sáinz, J.A., 1997. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors in Rat-1 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 272, 27330–27337.

- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero-Avila, M.T., González-Espinosa, C., García-Sáinz, J.A., 2000. Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *Journal of Biological Chemistry* 275, 6553–6559.
- 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). *Journal of Biological Chemistry* 269, 5241–5248.
- Wymann, M.P., Pirola, L., 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica Biophysica Acta* 1436, 127–150.