



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

DOCTORADO EN CIENCIAS

***“FOSFORILACION DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO A TRAVES DE
RECEPTORES CON ACTIVIDAD DE TIROSINA CINASA”***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. TZINDILU MOLINA MUÑOZ

ASESOR DE TESIS: DR. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ

MEXICO, D.F

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Adolfo García Sáinz.

El proyecto fue aprobado por donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (4583-Q) y por la Dirección General Asuntos del Personal Académico DGAPA (IN200206).

Durante la realización del proyecto la autora recibió una beca de Doctorado otorgada por el CONACYT (No. De becario 188840). Y una beca complemento de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM.

A DIOS

PARA EMILIANO Y ARTURO CON TODO MI AMOR
A MIS PADRES, GRACIAS POR TODO, LOS QUIERO.

A GUSTAVO Y ABRAHAM CON CARIÑO

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Adolfo García Sáinz por el apoyo y confianza que me brindo durante toda mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. María Teresa Rómero por su colaboración en el trabajo experimental y revisión de este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial, por el apoyo académico brindado durante todo el proyecto.

Dr. Adolfo García Sáinz

Dra. Clorinda Arias Álvarez

Dr. Rolando Hernández Muñoz

A los miembros del jurado, que corrigieron y enriquecieron este trabajo.

Presidente: Victoria Chagoya Hazas

Secretario: Dra. Clorinda Arias Álvarez

Vocal: Dr. Enrique Ortega Soto

Vocal: Dr. Carlos Rosales Ledezma

Vocal: Dr. Agustín Guerreño Hernández

A la Dra. Luz del Carmen Medina por su ayuda en la revisión de esta tesis.

A todos los integrantes del laboratorio: Lupita Jiménez, Rocío Alcántara, Alejandro Cabrera, Christian Colín, a Jean y Aurelio.

Y de forma especial a Ekaterina y a Tere Romero, por su amistad y confianza brindadas durante estos años.

A la Dra. Araceli Patrón Soberano y a Gabriel Orozco Oyuela, por su ayuda en el manejo del microscopio confocal.

Al Instituto de Fisiología Celular

Al posgrado en Ciencias Biomédicas

A la UNAM

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCION	5
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G.....	5
PROTEINAS G.....	7
<i>REGULACION DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G.....</i>	<i>9</i>
<i>DESENSIBILIZACION.....</i>	<i>9</i>
<i>DESENSIBILIZACION HOMOLOGA.....</i>	<i>9</i>
<i>GRKs.....</i>	<i>10</i>
<i>β-ARRESTINAS.....</i>	<i>10</i>
<i>GRKs Y β-ARRESTINAS EN LA DESENSIBILIZACION HOMOLOGA.....</i>	<i>11</i>
<i>DESENSIBILIZACION HETEROLOGA.....</i>	<i>13</i>
<i>TRANSACTIVACION.....</i>	<i>14</i>
<i>METALOPROTEASAS.....</i>	<i>15</i>
<i>RECEPTORES ADRENERGICOS.....</i>	<i>16</i>
RECEPOR α_{1b} -ADRENERGICO.....	18
VIA DE SEÑALIZACION DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO.....	20
REGULACION DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO.....	22
RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA 1	24
FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA 1.....	26

<i>VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DEL RECEPTOR DE IGF-1</i>	26
ANTECEDENTES.....	29
HIPOTESIS.....	31
OBJETIVOS GENERALES.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
<i>RESULTADOS</i>	42
<i>DISCUSION</i>	74
CONCLUSIONES.....	83
ANEXO.....	84
BIBLIOGRAFIA.....	85

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la regulación funcional por fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico a través del factor del crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1). La estimulación con el IGF-1 incrementó la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. La fosforilación inducida por el IGF-1 fue rápida, alcanzando su valor máximo a los 15 minutos y disminuyendo después de los 30 minutos. La fosforilación se observó a concentraciones bajas, EC_{50} 13 ng/ml. La fosforilación se asocia con la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico. El tratamiento de las células con el IGF-1 15 minutos provocó una disminución en la liberación del calcio intracelular y en la producción de fosfatos de inositol. La fosforilación inducida por el IGF-1 disminuyó notablemente en células tratadas con la *toxina pertussis*, lo que sugiere la participación de proteínas $G_{1/o}$. La transfección del carboxilo terminal de la cinasa GRK2 (BARK), el cual recluta al dímero $G\beta\gamma$ y la mutante negativa delta p85 de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), disminuyeron la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1. Utilizamos inhibidores de la PI3K: la wortmanina (WT) y el LY294002 (LY) y también inhibidores de la proteína cinasa C: la estaurosporina (ST) y la bisindoleilmaleimida (BIM). Los cuales bloquearon también la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. Además fue observado que el inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico, el AG1478; el inhibidor de las metaloproteasas, el BB-94 y el anticuerpo neutralizante del ligando HB-EGF disminuyeron también la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. El receptor α_{1b} -adrenérgico etiquetado con la proteína verde fluorescente, nos permitió visualizar en células vivas, el efecto producido por el IGF-1. Fue observada una disminución de los receptores en la membrana celular y un aumento de vesículas en el citoplasma, esto después del tratamiento de las células con el IGF-1.

Los datos demuestran que el IGF-1 activa una vía de señalización, que induce un aumento en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. Lo cual promueve la desensibilización e internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico.

ABSTRACT

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induces α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation. The effect of IGF-I was rapid and transient, reaching near-maximal values at 10 min and decreasing after 30 min; it was observed at low IGF-I concentrations ($EC_{50} > 13$ ng/ml) and was associated to receptor desensitization as evidenced by a decreased α_{1b} -adrenergic effect on intracellular calcium and production of inositol phosphates. The effect of IGF-I was markedly decreased in cells treated with pertussis toxin suggesting involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins. Transfection of the carboxyl terminus of the β -adrenergic receptor kinase or the $\Delta p85$ mutant of phosphoinositide 3-kinase markedly decreased the α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation induced by IGF-I without decreasing the receptor phosphorylation induced by noradrenaline. Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase and PKC blocked IGF-I-induced α_{1b} -adrenoceptor phosphorylation. In addition, it was observed that AG1478, an inhibitor of the EGF receptor kinase and BB-94, a metalloproteinase inhibitor, also diminished IGF-I-induced adrenoceptor phosphorylation. Confocal fluorescent microscopy showed that α_{1b} -adrenoceptors fused to the green fluorescent protein were located in the plasma membrane and in intracellular vesicles in the basal state. IGF-I induced a redistribution of the receptors favoring the intracellular location. Our data show that IGF-I induces desensitization of α_{1b} -adrenoceptors associated to receptor phosphorylation and internalization.

I. INTRODUCCION

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen la superfamilia de receptores de membrana involucrados en la transducción de señales extracelulares. En el ser humano, se estima que alrededor de 1000 miembros diferentes de esta superfamilia responden a una gran cantidad de ligandos endógenos, que incluyen, aminas biogénicas, péptidos, glicoproteínas, lípidos, nucleótidos e iones (Bridges and Lindsley, 2009).

Además, la percepción de estímulos exógenos tales como la luz, el olor y el gusto también están mediados por este tipo de receptores (Gether, 2000). Estos receptores de membrana controlan una gran variedad de procesos fisiológicos entre los que se pueden citar el metabolismo celular, la secreción, la diferenciación y el crecimiento celular, respuestas inflamatorias e inmune, así como la neurotransmisión. Por lo tanto, los receptores acoplados a proteína G representan dianas terapéuticas importantes para el desarrollo de nuevos fármacos con aplicaciones potenciales en prácticamente todos los campos de la medicina. Muchos agentes terapéuticos usados actualmente actúan bien activando (agonistas) o bloqueando (antagonistas) a receptores acoplados a proteína G. Por ejemplo, los agonistas de los receptores β -adrenérgicos se utilizan para tratar el asma, mientras que los antagonistas de estos receptores se usan habitualmente para tratar la hipertensión o la insuficiencia cardíaca (Binaei et al, 2003; Schmedtje et al, 2003). Otro ejemplo lo constituye el tratamiento de alergias y úlceras gastrointestinales donde se emplean antagonistas de los receptores de histamina H1 y H2, respectivamente (Arrang, 1994).

Los receptores acoplados a proteínas G no comparten en general una gran homología en su secuencia de aminoácidos (Kolakowski, 1994). La única característica estructural común entre todos los receptores acoplados a proteína G es la presencia de siete hélices que atraviesan la membrana y que están conectadas por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares, el dominio N-terminal orientado hacia el medio extracelular y el C-terminal hacia el medio intracelular (FIGURA 1).

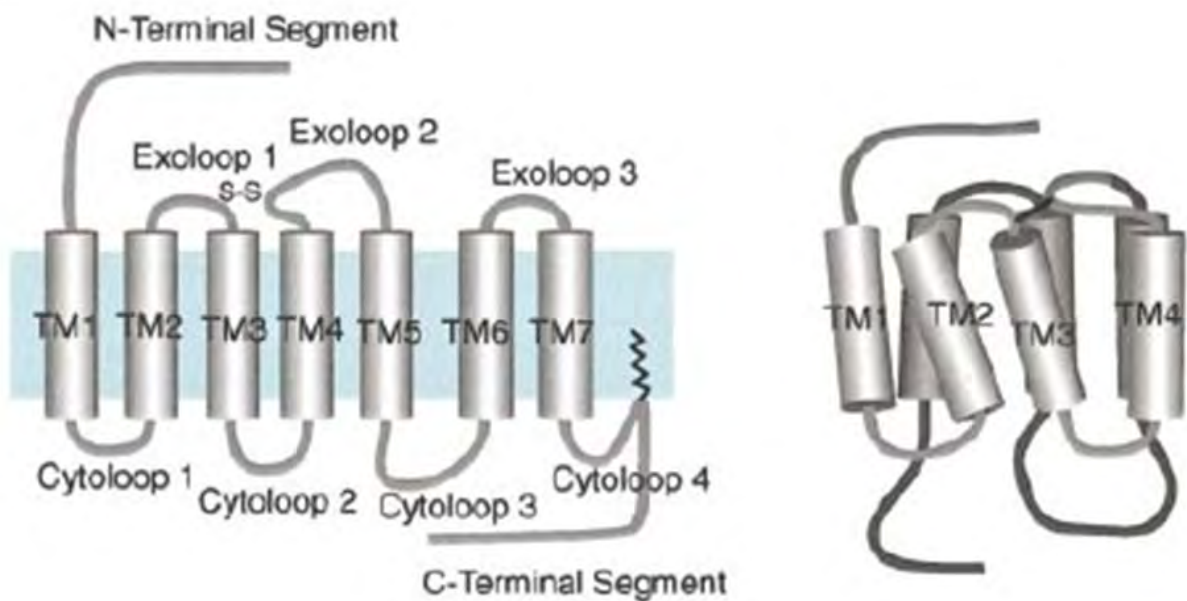


FIGURA 1. MODELO REPRESENTATIVO DE LA ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G. Los receptores acoplados a proteínas G, están formados por siete asas intracelulares, que están conectadas por tres bucles intracelulares y tres extracelulares, quedando la región N-terminal orientada hacia el medio extracelular y la región C-terminal localizada hacia el medio intracelular.

Los receptores acoplados a proteína G se han clasificado en tres familias: “A”, “B” y “C.”. La familia, “A” incluye a los receptores relacionados con la rodopsina y a los receptores β -adrenérgicos. Esta es la familia más numerosa de las tres. En esta familia, el ligando es normalmente reconocido en una cavidad formada por los dominios transmembranales. También se ha reportado que puede existir interacción con el ligando a nivel de las asas extracelulares y en el extremo N-terminal. El único residuo conservado en todos los receptores de la familia “A” es la arginina presente en el motivo Asp-Arg-Tyr (DRY) en la región C-terminal del tercer segmento transmembranal. Este motivo puede desempeñar un papel importante en la activación de la proteína G (Fraser et al, 1988).

La familia “B” contiene a los receptores relacionados con el receptor de glucagón e incluye aproximadamente 20 diferentes receptores para una gran variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos. Estos péptidos son reconocidos por la región N-terminal. Por último, la familia “C” incluye a los receptores relacionados con los receptores metabotrópicos de glutamato, los receptores sensibles a calcio y algunos receptores del GABA. La región N-terminal de estos receptores presenta una baja pero significativa homología con las proteínas PBPs bacterianas (*Periplasmatic binding proteins, por sus siglas en inglés*) encargadas del transporte de moléculas tales como péptidos, aminoácidos, azúcares o iones. En esta familia de receptores la región N terminal es el que interviene en la unión del ligando.

PROTEINAS G

Las proteínas G reciben la información desde los receptores y la transducen a los efectores proteicos: enzimas o canales iónicos, que movilizan a los segundos mensajeros intracelulares. Forman parte de una gran familia de GTPasas en la que se incluyen: a) proteínas G de bajo peso molecular (20-25 kDa). Como las subfamilias Ras, Eho, Rab, y Rac que participan en la proliferación y diferenciación celular, en el transporte vesicular, en la organización del citoesqueleto y en la regulación de funciones nucleares (Bhattacharya, et al, 2004). Y b) proteínas G

heterotriméricas formadas por tres subunidades α , β , y γ con pesos moleculares de 40-46 Kda, 37 kda y 7-9 Kda, respectivamente (Bourne, et al, 1990; Feig, 1994).

Las proteínas $G\alpha$, se han dividido en cuatro subfamilias: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$. La subfamilia G_s , activa a la adenilil ciclasa y a canales de calcio. Mientras que la activación de la proteína $G_{i/o}$ lleva a la inhibición de la adenilil ciclasa. La subfamilia $G_{q/11}$, activa a la fosfolipasa C beta (PLC- β). Y la activación de la proteína $G_{12/13}$ está implicada en la regulación de pequeñas proteínas G, como Rho y Rab (Neer, 1995).

La subunidad β y la subunidad γ forman el complejo estable $\beta\gamma$ que solamente es disociable en condiciones desnaturalizantes (Neer y Clapham, 1988). El complejo $\beta\gamma$ participa en la activación de la fosfolipasa A2, de la fosfatidilinositol 3 cinasa, la fosfolipasa C o la adenilil ciclasa (Kleuss, et al, 1993).

Las proteínas G existen en su estado inactivo formando un trímero entre la subunidad α y las subunidades $\beta\gamma$. La activación de los receptores acoplados a proteínas G, lleva al intercambio de GDP por GTP de la subunidad α de la proteína G. La subunidad $G\alpha$ -GTP adopta su conformación activa y se disocia de la subunidad $G\beta\gamma$. La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α hidroliza el GTP a GDP, por lo que el sistema regresa a su estado basal (Gilman, 1987).

Las subunidades α presentan residuos que pueden ser modificados covalentemente por toxinas bacterianas. La *toxina del cólera* cataliza la transferencia de una unidad de ADP-ribosa desde el NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) a un residuo de arginina de las subunidades α de las proteínas G_s (Murayama, et al, 1993). La *toxina pertussis* cataliza la transferencia de una unidad de ADP-ribosa desde el NAD a aquellas subunidades α que poseen un residuo de cisteína del extremo carboxilo terminal. Las proteínas G que pueden sufrir esta modificación son las G_i , G_o y la transducina.

La modificación de las subunidades α por la *toxina del cólera*, conduce a una activación continua de estas proteínas (por inhibición de la actividad GTPasa), mientras que la modificación por la *toxina pertussis* impide la activación de la proteína G por el receptor (García-Sáinz, et al, 1992; Neer, 1995).

II. REGULACION DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G

Desensibilización

La regulación de los receptores acoplados a proteínas se lleva a cabo a través de dos procesos, llamados desensibilización y resensibilización. Ambos son eventos importantes en la adaptación de la célula ante los estímulos que recibe. En la desensibilización participan una serie de procesos, por los cuales los receptores acoplados a proteínas G presentan una atenuación de su respuesta, ya sea por el desacoplamiento de su proteína G, o bien una disminución en el número de receptores en la membrana, provocando la internalización y degradación de éstos. Uno de los procesos importantes que es responsable de esta regulación es la fosforilación de los receptores. La fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G la realizan dos tipos de cinasas: las GRKs (cinasa de los receptores acoplados a proteínas G) y las cinasas activadas por segundos mensajeros, como la PKC (Proteína Cinasa C) y la PKA (Proteína Cinasa A). Para su estudio el proceso de desensibilización se ha clasificado en desensibilización homóloga y heteróloga (revisado en García-Sáinz, et al, 2008).

Desensibilización Homóloga

La **desensibilización homóloga**, se caracteriza por la disminución en la respuesta del receptor, al ser estimulado por su agonista (Freedman and Lefkowitz, 1996; García-Sáinz, et al, 2008). Este proceso se lleva a cabo en tres etapas consecutivas. En una primera etapa, el receptor se fosforila por la acción de las GRKs (*G-protein-coupled receptor kinases*, por sus siglas en inglés) que específicamente fosforilan al receptor unido al ligando.

En una segunda etapa, las β -arrestinas, proteínas que se unen de manera específica a los receptores una vez fosforilados, previenen su acoplamiento a las proteínas G.

GRKs

Las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) constituyen una familia de siete miembros (GRK1-GRK7), que fosforilan residuos de serina/ treonina de receptores activados por su agonista. Esta fosforilación promueve procesos de internalización, reciclaje y/o degradación de receptores acoplados a proteínas (Moore et, al, 2007). La familia de GRKs se agrupa en tres subfamilias. Las GRKs visuales, presentes en bastones y conos (GRK1 Rodopsina cinasa y GRK7), la subfamilia de la cinasa del receptor β 2-adrenérgico (GRK2 y GRK3) y la subfamilia de GRK4, que incluye a las isoformas: GRK4, GRK5, GRK6 y a sus isoformas de procesamiento alternativo: GRK6A, B y C (Premont and Gainetdinov 2007).

Las GRKs están formadas por un dominio central catalítico muy conservado, un extremo N-terminal y un extremo C-terminal. Exceptuando a las GRKs visuales, todas las demás incluyen un dominio de homología a RGS N-terminal, que en el caso de GRK2/3 permite su interacción con proteínas $G_{\alpha q/11}$. El extremo C-terminal contiene los determinantes necesarios para la localización correcta de estas proteínas en el citosol y también poseen un dominio de homología a plekistrina (PH), capaz de interactuar con los fosfolípidos de membrana (Moore, et al, 2007).

β -arrestinas

La fosforilación de receptores dependientes de GRKs, promueve la asociación de las proteínas β -arrestinas, las cuales no sólo participan en el desacoplamiento de las proteínas G, sino que permiten iniciar nuevas cascadas de señalización y regulan la actividad y la estabilidad de otras proteínas, incluidas las propias GRKs (Moore, et al, 2007).

La familia de las β -arrestinas están formada dos grupos: las β -arrestinas visuales y las β -arrestinas somáticas. El grupo de las β -arrestinas visuales está formado por las β -arrestinas 1 y 4, localizadas exclusivamente en retina. Su función queda restringida a la vía de fototransducción. El grupo de las β -arrestinas somáticas, está formado por las β -arrestinas 2 y 3. Ambas se expresan en la mayoría de los tejidos.

La β -arrestina 1 se localiza tanto en núcleo como en citosol, mientras que β -arrestina 2 se localiza principalmente en citosol. La aparente exclusión nuclear de β -arrestina 2 se debe a la presencia de una señal de exportación nuclear de la que carece la β -arrestina 1 (Scott et al, 2002). Ambas proteínas se translocan a la membrana plasmática tras la estimulación de receptores acoplados a proteínas G. y por algunos receptores con actividad de cinasa de tirosina, como el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1R), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) o el receptor de la insulina (Girnita, 2005; Usui, 2004).

Papel de las GRKS y de las β -arrestinas en la desensibilización homóloga.

El mecanismo propuesto para explicar la regulación de los GPCRs por las GRKs es el siguiente: cuando el receptor es activado por su ligando, se induce un cambio conformacional, el cual favorece la interacción con las proteínas G, produciendo una disociación del heterotrímero. El dímero $\beta\gamma$ disociado forma un complejo con el fosfolípido PIP_2 , el cual se une al carboxilo terminal de la GRK. translocandola del citoplasma a la membrana celular. Una vez en la membrana, la GRK aumenta su actividad catalítica e induce la fosforilación del receptor. en su extremo carboxilo terminal

La fosforilación del receptor por las GRKs, permite la interacción con las β -arrestinas. Las β -arrestinas asociadas impiden la interacción entre el receptor y las proteínas G. En este estado el receptor se encuentra ya desensibilizado.

Además de impedir el acoplamiento entre receptor y proteína G, las β -arrestinas también juegan un papel muy importante en la internalización de muchos receptores acoplados a proteína G, como son el receptor β -adrenérgico, el receptor

Desensibilización Heteróloga

La **desensibilización heteróloga**, ocurre cuando un receptor es activado por su agonista, para afectar la respuesta de otro receptor distinto. En este tipo de desensibilización participan las cinasas dependientes de segundos mensajeros, como son la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC). Actualmente se sabe que esas cinasas son capaces de fosforilar a los GPCRs en sitios distintos a los que fosforilan las GRKs. (Lefkowitz, et al, 1990). La desensibilización heteróloga, entre receptores acoplados a proteínas G y receptores con actividad de cinasa de tirosina, ha sido ampliamente estudiada (revisado en García-Sáinz, et al, 2008). Un ejemplo clásico de este tipo de regulación es el realizado con el receptor β_2 -adrenérgico y el receptor de insulina, en donde el receptor de insulina, utiliza dos vías para inducir la fosforilación del receptor β_2 -adrenérgico: 1) a través de la activación directa del receptor β_2 -adrenérgico en sus residuos de tirosina 350 y 364. 2) De forma indirecta, a través de la activación de la PI3K /Akt, que fosforilan al receptor β_2 -adrenérgico en las serinas 345 y 346 (revisado en García-Sáinz, et al., 2008).(Figura 3)

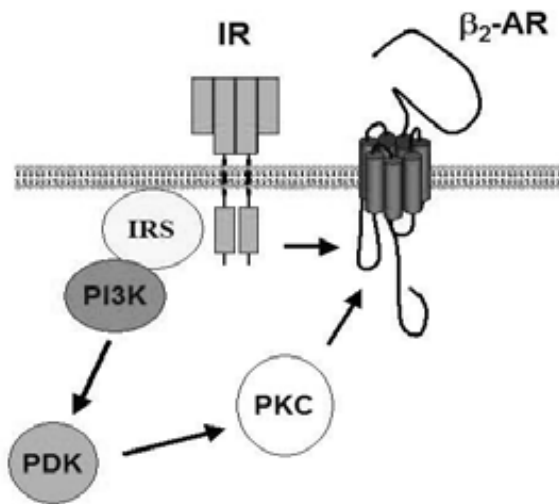


FIGURA 3. LA DESENSIBILIZACION HETEROLOGA DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G. La activación de los receptores con actividad de tirosina cinasa, produce la activación de proteínas como la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y la proteína cinasa C (PKC). La activación de estas proteínas promueve la fosforilación y la desensibilización de los GPCRs. (Tomado de García-Sáinz, et al, 2008)

Transactivación

Un modelo de desensibilización heteróloga que ha sido propuesto, es la **transactivación**. Los receptores acoplados a proteínas G inducen la transactivación de los receptores con actividad de tirosina cinasa, por medio de la actividad proteolítica de metaloproteasas, las cuales hidrolizan factores de crecimiento de la matriz extracelular.

La **transactivación** ha sido ampliamente estudiada para el receptor de EGF, éste receptor controla una gran variedad de funciones biológicas, como son la proliferación celular, la diferenciación, la migración celular y la modulación de la apoptosis (Fisher, et , al 2003). La estimulación del receptor del EGF por su ligando en el dominio extracelular, promueve la dimerización del receptor, provocando su fosforilación. Esta fosforilación crea dominios de fosfotirosinas que activan la cascada de señalización del receptor. Han sido descritos ocho ligandos para el receptor de EGF: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento epidérmico que une a heparina (HB-EGF), la amfiregulina, el factor de crecimiento transformante alfa (TNF- α), la betacelulina, la epiregulina, el epigen y el crypto. (Fisher et, al., 2003; Nishia and Klagsbrunb,2004).

El proceso de transactivación, juega un papel importante en la señalización de diferentes tipos de receptores como son: receptores acoplados a proteínas G, receptores de citocinas, entre otros. La transactivación del receptor de EGF, fue originalmente descrita por el grupo de Ulrich, (Daub, et, al 1996). Ellos observaron que el tratamiento de fibroblastos de rata con ácido lisofosfatídico (LPA), endotelina (ET) o trombina, provocaba una rápida fosforilación del receptor de EGF y la subsecuente activación de su vía de señalización. De forma interesante observaron la participación de proteínas G relacionadas en este proceso de transactivación (Fisher et, al., 2003; Nishi and Klagsbrun, 2004; Higashiyama, 2004).

Prenzel y colegas (Fisher, et., al 2003), fueron los primeros en demostrar que el procesamiento proteolítico del HB-EGF mediado por metaloproteasas produce una transactivación del receptor de EGF (Nishi and Klagsbrun, 2004; Higashiyama, 2004) (Fisher, et , al 2003; Nishi and Klagsbrun, 2004; Higashiyama, 2004).

Metaloproteasas

Las metaloproteasas (MMPs Matrix Metalloproteinases, por sus siglas en inglés), son endopeptidasas que participan en el remodelamiento y degradación de la matriz extracelular. Están involucradas en la degradación de la colágena, proteoglicanos, laminina y fibronectina. Las MMPs llevan a cabo funciones como la remodelación del tejido conectivo y están implicadas en procesos del desarrollo embrionario. En condiciones fisiológicas normales, la actividad de las MMPs es regulada por los inhibidores endógenos de las metaloproteasas (TIMPs, Tissue Inhibitors of MMPs, por sus siglas en inglés). La alteración en la regulación de la actividad de las MMPs está relacionada en enfermedades como el cáncer, fibrosis, artritis y aterosclerosis (Beaudeau, et al, 2004; Higashiyama, 2004).

Han sido descritas 23 diferentes miembros de la familia de las MMPs, las cuales son codificadas por diferentes genes y secretadas por una gran variedad de tipos celulares. La estructura de todas las MMPs está conformada por tres dominios : un predominio, un prodominio y un dominio catalítico. El predominio es cortado después de la secreción celular y está ausente en la forma activa de la enzima. El prodominio mantiene la actividad enzimática en la forma latente y comprende una secuencia de péptidos con un residuo de cisteína que interactúa con el dominio catalítico. Este último contiene un átomo de zinc unido por tres residuos de histidina. La liberación proteolítica del prodominio resulta en la liberación del átomo de zinc del residuo de cisteína, resultando en la activación del dominio catalítico.

III. .RECEPTORES ADRENERGICOS

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Los ligandos naturales de los receptores adrenérgicos son las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina. Los receptores adrenérgicos están estructuralmente formados por un extremo amino terminal extracelular. Presentan siete segmentos de 20 a 25 residuos de aminoácidos hidrofóbicos que forman los extremos transmembranales, conectados por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. Y tienen un extremo carboxilo terminal intracelular. El sitio de unión al ligando se encuentra localizado dentro de los dominios transmembranales, 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 contraión para contrarrestar la carga de la noradrenalina 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 las asas II y III intracelulares (García-Sáinz, et al, 2000, Diviani, et al, 1997).

Existen tres familias de receptores adrenérgicos, los α_1 , α_2 y los β . De los cuales se han identificado nueve subtipos en total: 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 ligandos y en las vías de transducción que activan (García-Sáinz, 2000). Los receptores α_1 -adrenérgicos activan la vía de recambio de fosfoinosítidos- Ca^{2+} . Los receptores α_2 -adrenérgicos inhiben la vía de la adenilil ciclasa. Los receptores β -adrenérgicos activan la vía de la adenilil ciclasa.

Los subtipos de receptores α_1 adrenérgicos que han sido clonados son el receptor α_{1A} , el receptor α_{1b} , y el receptor α_{1D} . Los cuales son capaces de activar la vía de recambio de fosfoinosítidos- Ca^{2+} . Aunque sean observado diferencias en la eficiencia para producir la respuesta intracelular. Los receptores α_{1A} -adrenérgicos son los más eficientes, seguidos por los receptores α_{1b} y los menos eficientes son receptores α_{1D} adrenérgicos (García-Sainz, 1996; Coge, et al, 1999).

Los receptores α_1 adrenérgicos se expresan en la mayoría de los tejidos, incluyendo el cerebro, el corazón, las arterias, el hígado, el riñón, la próstata y el bazo. Existe una diversidad de los receptores adrenérgicos entre las diferentes especies animales. En el hígado humano se expresa el mRNA del receptor α_{1A} , (García-Sáinz et al. 1995) y en el hígado de rata el receptor α_{1b} (García Sáinz, et al, 1993). En el ser humano el receptor α_{1A} , es expresado predominante en el corazón, la corteza cerebral y la próstata (Pierce, et al; 1994). Los vasos deferentes y otros músculos lisos expresan predominantemente los receptores α_{1D} y α_{1A} (Piasick, et al; 1999). El receptor 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 muchos procesos fisiológicos esenciales como la regulación del equilibrio hídrico y de electrolitos, la contracción uterina, la regulación del ritmo cardiaco, 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 α_1 adrenérgicos, al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, activan respuestas mitogénicas y transcripcionales en varios tipos

celulares. Estos participan en procesos del desarrollo, como en la regulación del crecimiento, la diferenciación y la proliferación celular (Zhong and Minneman, 1999).

Receptor α_{1b} -adrenérgico

El receptor α_{1b} -adrenérgico fue el primero de los tres receptores α_1 en ser clonado. Este receptor presenta un tamaño de 516 aminoácidos, de los cuales 46 pertenecen al extremo amino-terminal. Las dos primeras asas intracelulares contienen residuos de cisteína importantes, que permiten el plegamiento correcto de la proteína. En la tercera asa intracelular se encuentran localizados los aminoácidos (Arg²⁵⁴, Lys²⁵⁸ y Leu¹⁵⁸), en donde se lleva a cabo la interacción con las proteínas G. El extremo carboxilo terminal del receptor es de suma importancia para la fosforilación y desensibilización del receptor. Se han caracterizado los sitios de fosforilación por las GRKs, siendo estos la Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸, y la Ser⁴¹⁰ (Diviani, et al 1997). Los sitios de fosforilación por la PKC en el carboxilo terminal, son las Ser³⁹⁴ y la Ser⁴⁰⁰. (FIGURA.4).

La fosforilación inducida por la PKC, ha sido estudiada, mediante el uso de ésteres de forbol (TPA), los cuales activan directamente a la proteína cinasa C, desensibilizando al receptor α_{1b} -adrenérgico (García-Sáinz et al, 1999b).

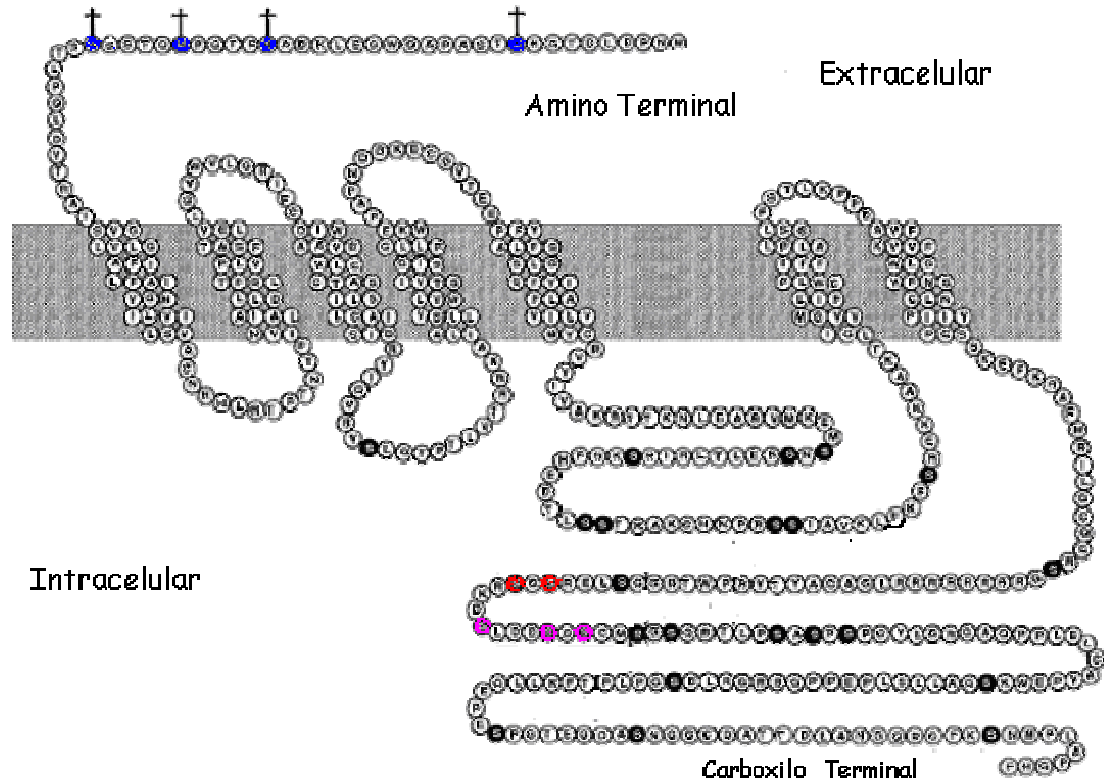


FIGURA 4. Modelo estructural del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster. El esquema muestra la secuencia de aminoácidos, los sitios de dominios transmembranales los sitios de glicosilación (●), el sitio de reconocimiento a $G\alpha_q$ (●), y los sitios de fosforilación a PKC (●), a GRK (●) (Tomado de Cotecchia, et al., 1997).

Vía de señalización del receptor α_{1b} .adrenergico

El receptor α_{1b} .adrenergico esta acoplado a la vía de señalización que activa el recambio de fosfoinositidos- Ca^{2+} . El agonista se une al receptor en la tercera asa transmembranal, éste sufre un cambio conformacional, que permite el acoplamiento y el recambio de GDP por GTP en las proteínas $G_{q/11}$. Las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G sufren un cambio conformacional y son liberadas del complejo. La subunidad α promueve la activación de la fosfolipasa C- β , (PLC β), que se encuentra localizada en la membrana celular. La PLC β 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 (IP_3). El IP_3 activa a su receptor-canal, ubicado en el retículo endoplásmico y libera Ca^{2+} al citoplasma. El Ca^{2+} y el diacilglicerol 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 permiten a las células tener un control preciso y regulado de sus funciones fisiológicas. (FIGURA.5)

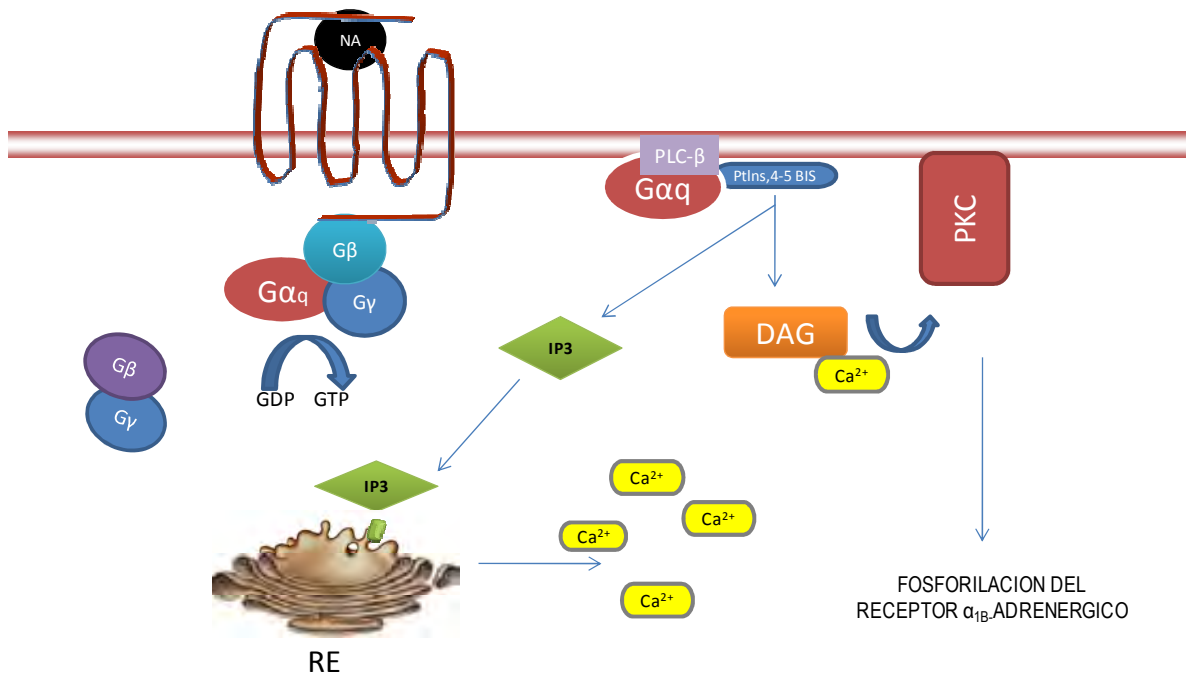


FIGURA 5. VIA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO. La unión de la noradrenalina (NA), con el receptor α_{1b} -adrenérgico, promueve un cambio conformacional, que permite el acoplamiento y la hidrólisis de GDP a GTP de las proteínas $G_{q/11}$. Las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G sufren un cambio conformacional y son liberadas del complejo. La subunidad α promueve la activación de la fosfolipasa C- β , (PLC β), que se encuentra localizada en la membrana celular. La PLC β 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 (RE) y libera Ca²⁺, al citoplasma. El Ca²⁺ y el DAG producido activan a la proteína cinasa C (PKC). La PKC, fosforila al receptor α_{1b} -adrenérgico.

Regulación del receptor α_{1b} -adrenérgico

En la desensibilización heteróloga, también conocida como regulación cruzada, participan la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA). Ambas cinasas regulan al receptor α_{1b} -adrenérgico. Esta regulación provoca una disminución de la respuesta funcional del receptor α_{1b} -adrenérgico a través de la activación de otro tipo de receptores (Benovic et al, 1985).

Una de las principales evidencias del proceso de desensibilización heteróloga, 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 consensos 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 AT_1 (García-Caballero, et al. 2001), los receptores AT_2 (Olivares Reyes, et al., 1997). Además los receptores adrenérgicos tienen una sensibilidad diferente por el TPA. Por ejemplo, el receptor α_{1A} , no es sensible al TPA, en cambio los receptores α_{1b} - y α_{1D} -adrenérgicos si son sensibles al TPA (Vázquez-Prado et al., 2000; García-Sáinz, et al., 1999; García-Sáinz, et al., 2000)

Otra enzima que participa en la desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico, es la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K). La PI3K 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 fosfatidilinositol y de sus derivados como el fosfatidilinositol 4-5-bisfosfato. Los fosfoinosítidos fosforilados en la posición 3', actúan como segundos mensajeros que activan de manera directa o indirecta a diferentes

proteínas cinasas, por ejemplo a diferentes isoformas de la proteína cinasa C (PKC), a la proteína cinasa B (PKB) y las proteínas dependientes de fosfoinositos 1-2 (PDK-1/2) (Cantley, 2002).

La fosforilación y desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico, es inducida también por la activación de otros receptores acoplados a proteínas G, como son: el receptor de endotelina (ETA) (Vázquez-Prado et al., 1997) y el del ácido lisofosfatídico (LPA) (Casas-González ,et al., 2000). El receptor de bradicidina (B2) fosforila pero no induce la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico (Medina, et al., 1998). Receptores con actividad de cinasa de serina/treonina como: el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), también inducen la fosforilación y desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico (Romero-Ávila, et al., 2003). Los receptores con actividad de cinasa de tirosina, como son: el del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Medina, et al., 1998), y el receptor de insulina (García-Sáinz, et al 2004) también inducen la fosforilación y desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico.(FIGURA.6)

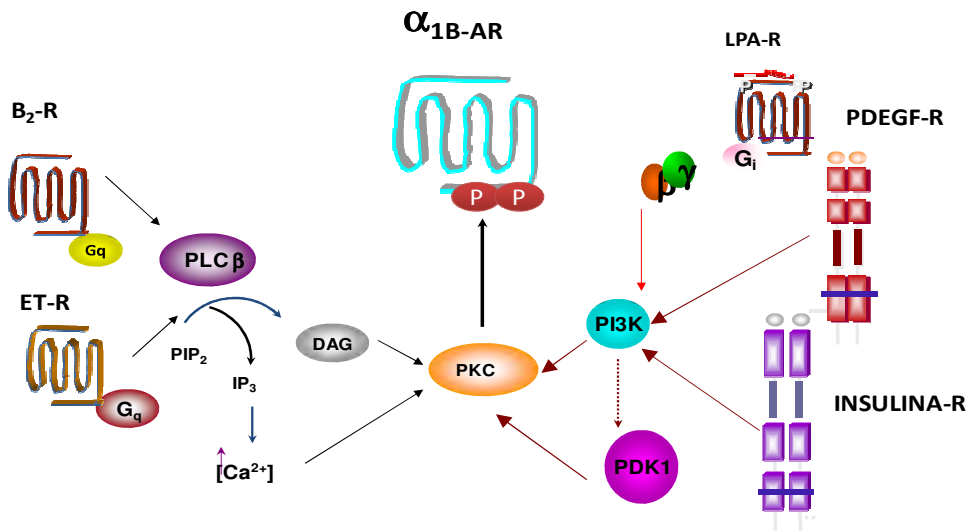


FIGURA 6. Esquema representativo de los receptores que inducen la desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico (α_{1b} -AR). Los receptores acoplados a proteínas G: B₂-R (Bradicinina), ET-R (Endotelina), LPA-R (Acido lisofosfatídico). Los receptores con actividad de cinasa de tirosina: PDGF-R (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas), Insulina-R (Insulina). proteína cinasa C, (PKC),. Fosfolipasa C β , (PLC- β); Diacil Glicerol (DAG); Fosfatidilinositol 3 cinsa (PI3K); Cinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK-1).

IV. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA

El receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1R), pertenece a la familia de receptores con actividad de cinasa de tirosina. El IGF-R regula las acciones biológicas del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1). El receptor del IGF-1 es sintetizado como una sola cadena peptídica de 300-400 residuos de aminoácidos. En su transporte hacia la membrana, los pre-receptores son glicosilados, doblándose y dimerizándose bajo la guía de proteínas chaperonas, para posteriormente ser transportados al aparato de Golgi. En el aparato de Golgi son procesados por la furin-proteasa, la cual genera las subunidades maduras del receptor: la subunidad α (130-135 kDa) y la subunidad β (90-97 kDa). Posteriormente se lleva a cabo el ensamblaje de las subunidades a través de puentes disulfuro. La organización del pre-proreceptor ha sido establecida mediante análisis de secuencia, demostrándose la siguiente disposición: NH_2 peptido señal-subunidad α -subunidad β COOH . El receptor completo es una glicoproteína de membrana compuesta por dos subunidades α extracelulares de 115 kDa y dos subunidades β intracelulares de 95 kDa. Ambos tipos de subunidades están unidas por puentes disulfuro, formando un complejo (Dupon and Holzenberger, 2003). La subunidad α contiene una región rica en cisteína y sitios potenciales de glicosilación. La subunidad β es una cadena transmembranal con un dominio intracelular enzimático de tirosina cinasa y un sitio de unión para ATP (LeRoith, et al, 1995). (FIGURA7)

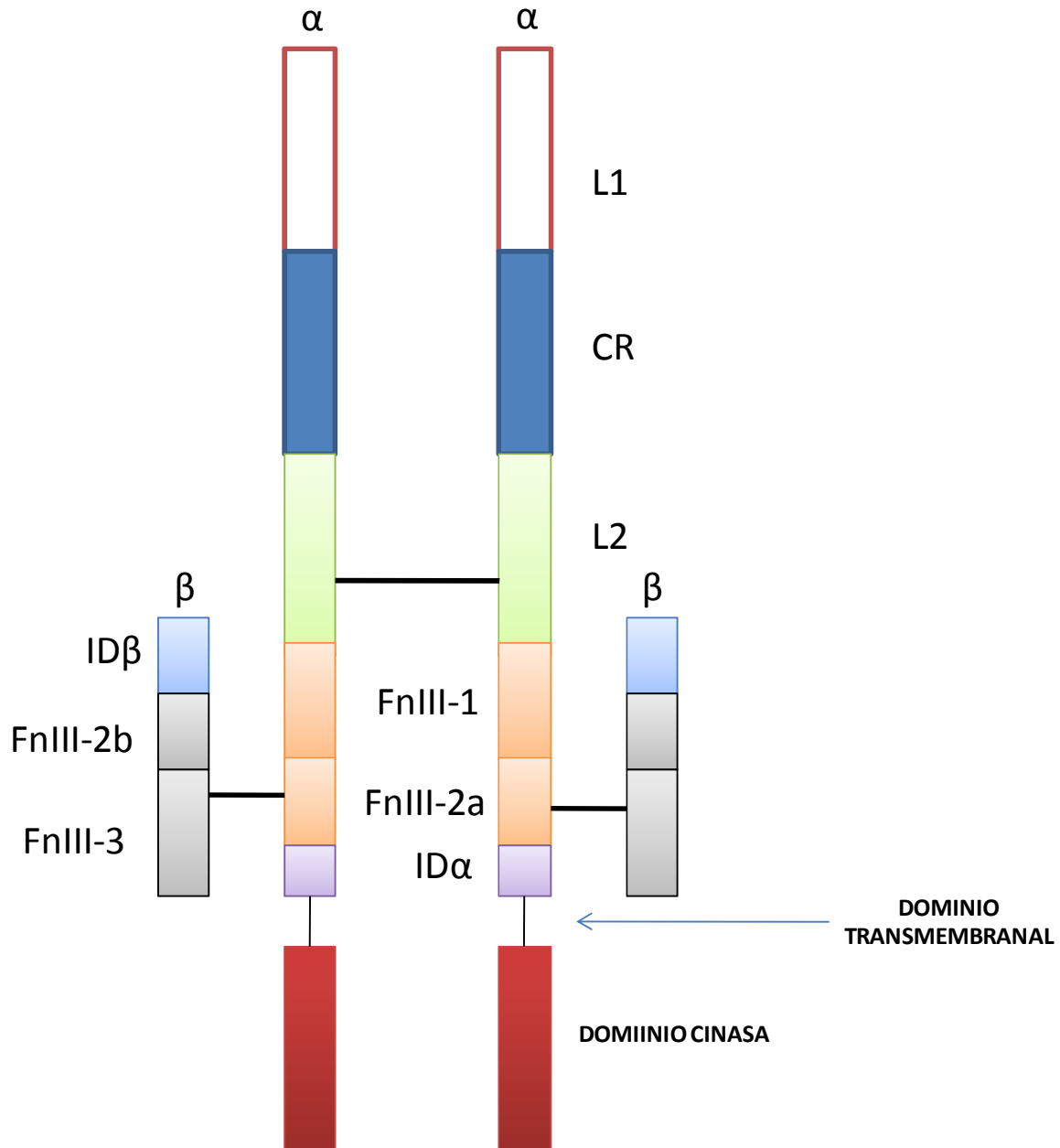


FIGURA 7. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE IGF-1. El receptor del IGF-1 es una glicoproteína de membrana compuesta por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β intracelulares. Ambos tipos de subunidades están unidas por puentes disulfuro, formando un complejo heterodímero. La subunidad α contiene un dominio de unión al ligando (L1). Una región rica en cisteína (CR) y once sitios potenciales de glicosilación. La subunidad β es una cadena transmembranal que contiene cuatro ectodominios parecidos a la fibronectina (FnIII), y un dominio intracelular enzimático de cinasa de tirosina con un sitio de unión para ATP. (Modificado de Adams, et al, 2000).

Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1)

El IGF-1, es un factor de crecimiento que se expresan de forma muy regulada y participan de forma esencial en procesos de diferenciación, crecimiento y desarrollo tisular (Dupon and Holzenberger, 2003). El IGF-I es un polipéptido de cadena sencilla, con un peso molecular de 7.5 kDa. El IGF se expresan, tanto en el desarrollo embrionario como en la vida adulta, en gran variedad de tejidos entre los que se incluyen músculo, pulmón, hígado, riñones y cerebro (Dupon and Holzenberger, 2003). La hormona de crecimiento es captada por el hígado donde promueve la síntesis y secreción del IGF-1 en sangre. En la sangre, el IGF-1 es transportado hasta los tejidos diana en los que ejercerá su efecto (Hernández-Sánchez, et al, 1995). Las acciones biológicas del IGF-1, están moduladas por una familia de seis proteínas transportadoras (IGFBPs 1-6). Las IGFBPs controlan la disponibilidad del IGF-1 y regulan la interacción con sus receptores (Dupon and Holzenberger, 2003). La IGBP-3 es la proteína que transporta el 95 % del IGF-1 presente en el torrente sanguíneo circulatorio. De esta forma el péptido es protegido de la degradación proteica, y se prolonga su vida media de 10 minutos en forma libre a unas 5-6 horas en forma unida con la IGFBP-3 (Bar et al., 1990; Dupon and Holzenberger, 2003).

Vía de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1

La unión del IGF-1 a la subunidad α de su receptor produce una autofosforilación en la región citoplásmica de la subunidad β del receptor. Así como, fosforilaciones en tirosinas en una serie de proteínas, entre las que destacan los sustratos del receptor de insulina (Insulin Receptor Substrates o IRSs, por sus siglas en inglés) y la proteína SHC. Los sustratos del receptor de insulina más conocidos son el IRS-1 y el IRS-2. El IRS-1 está muy conservado en todas las especies y presenta, al menos 21 sitios potenciales de fosforilación en tirosina. El IRS-1 crea sitios de unión a proteínas con dominios SH2 (dominios homólogos a Src, tipo 2), como la subunidad p85 de la PI3K, GRB2 (Growth Factor Receptor Bound-2, por sus siglas en inglés), syt, Nck y Crk. Tanto el IRS-1 como la proteína

SHC, inician cascadas de señalización intracelular que se agrupan en dos vías principales: La vía de la PI3K y la vía de las MAPKs.

La vía de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) está implicada principalmente, en procesos metabólicos, de crecimiento celular y antiapoptóticos. El receptor de IGF-1 fosforila al IRS-1, activándolo. El IRS-1 interacciona con la subunidad reguladora p85 de la PI3K. La p85 activa a la subunidad catalítica p110, de la PI3K y produce la formación de fosfoinosítidos fosforilados en la posición 3'. Estos fosfoinosítidos activan a la serina treonina cinasa PKB ó Akt. Estos derivados también provocan la activación de algunas isoformas de la PKC como son las isoformas: ϵ , η , y ξ (Dupon yHolzenberger, 2003).

La vía de las MAP cinsas (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK, por sus siglas en inglés): regula procesos de mitogénesis y de diferenciación celular . La fosforilación de SHC por el receptor de IGF-1 induce la activación de la GTPasa Ras. Ras induce el anclaje a la membrana y la activación de la serina treonina cinasa Raf. Raf conduce a la activación de otra serie de proteínas como son las MAPKK (MEKs), las MAPK (ERKs) y factores de transcripción, como c-jun, Elk1, c-fos y c-myc (Dupon and Holzenberger, 2003). (FIGURA.8).

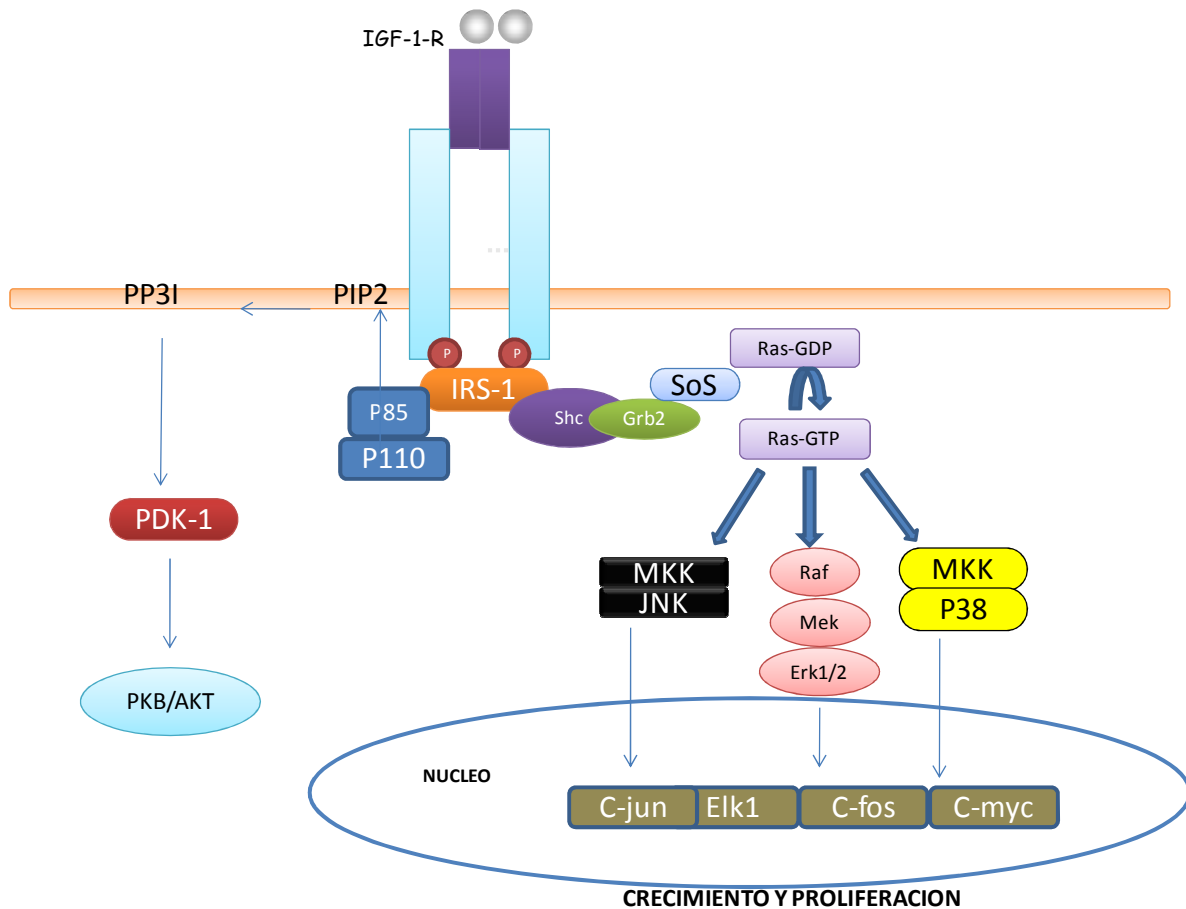


FIGURA 8. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE IGF-1. El IGF-1 se une a su receptor, provocando que éste sufra un cambio conformacional, que permite la autofosforilación en tirosinas, activándolo. El receptor activo, fosforila al IRS-1. El IRS-1 interactúa con la subunidad p85, la subunidad reguladora de la PI3K y ésta activa a la subunidad p110, la subunidad catalítica de la PI3K y produce la formación de fosfoinosítidos fosforilados en la posición 3', que activan a la PDK-1. PDK-1 interactúa con la serina treonina quinasa PKB/Akt. La fosforilación de SHC por el IRS-1, induce la activación de la GTPasa Ras. Ras induce la activación de la serina treonina quinasa Raf que, a su vez, conduce a la activación de otra serie de proteínas como son las MAPKK (MEKs), ERK1/2, JNK, P38 y otras proteínas-quinasas; las cuales activan factores de transcripción.

V. ANTECEDENTES

Los procesos de fosforilación y desensibilización han sido estudiados ampliamente en nuestro laboratorio. Como ya se indicó previamente, la activación de los receptores no-adrenérgicos induce la fosforilación y desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico. La PKC y PI3K jugar un papel importante en el proceso de desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico (García-Sáinz, et al, 2000; Diviani, et al, 1997).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la activación de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a las proteínas G, como los receptores de endotelina, (ETA), (Vazquez-Prado, et, al, 1997) y receptores para el ácido lisofosfatídico (LPA), (Casas-González, et, al., 2000); son capaces de inducir la fosforilación y la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico. Así como también por receptores con actividad de serina/treonina cinsas, como el receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), (Rómero-Ávila, et al., 2003).l

Los receptores con actividad de cinasa de tirosina como la insulina (García-Sáinz, et, al., 2004), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Medina, et, al, 1998), también pueden inducir la fosforilación y desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico.

Existe evidencia que sugiere que los receptores con actividad de cinasa de tirosina pudieran interaccionar con las proteínas de G heterotrimericas, particularmente a las de la familia de Gi (Patel, 2004; Nishimoto, et, al, 1987). El grupo de Nishimoto, (Nishimoto, et al, 1987), demostró que el receptor del IGF-1 era capaz de interaccionar con proteínas G hetrotriméricas. Esencialmente el estudio mostró que el incremento en la liberación de calcio intracelular y la síntesis del DNA que el IGF-1 indujo, fueron inhibidas por el tratamiento con la *toxina pertussis*. El interés por conocer la interacción del receptor de IGF-1 y las proteínas Gi, mostraron que la vía de activación de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), fue sensibles a *la toxina pertussis* (Lutrell, 1995). Estudios más recientes mostraron que el receptor del IGF-1 se asocia con las subunidades

Gai y con el dímero $G\beta\gamma$. (Hallak et al., 2000; Dalle et al., 2001). Además en células de músculo liso de intestino humano, la activación de los receptores del IGF-1, mostraron una disminución en la actividad de la adenilato ciclasa al ser tratadas con toxina pertussis (Kuemmerle and Murthy, 2001).

La activación de las proteínas G sensibles a la *toxina pertussis* por el receptor del ácido lisofosfátidico (LPA), induce la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico vía el HB-EGF por las metaloproteasas, que lleva a la activación autócrina de los receptores de EGF, el cual lleva a la activación de la PI3K y de la PKC (Casas, et al, 2003)

El interés de este trabajo reside en conocer si el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), es capaz de fosforilar, desensibilizar e internalizar al receptor α_{1b} -adrenérgico a través de una vía de señalización que involucre la participación de proteínas G sensibles a la *toxina pertussis* y la transactivación del receptor de EGF.

VI. HIPOTESIS

La fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico por la activación de los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina-1, induce la desensibilización e internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico.

VII. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue establecer el mecanismo de desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico, inducido por la activación de los receptores del IGF-1.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Medir el estado de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, después del tratamiento con el IGF-1, en las líneas celulares Rat-1, Cos-1 y DDT1MF2.
2. Medir la formación de los segundos mensajeros: Ca^{2+} y fosfatos de inositol, después del tratamiento con el IGF- 1.
3. Determinar en estudios de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1, la participación de las proteínas G_i , con el tratamiento de la toxina pertussis
4. Conocer el papel de las posibles proteínas cinasas PI3K y PKC, con el uso de inhibidores selectivos, el estado de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, a través de la activación de los receptores del IGF-1.
5. Evaluar el estado de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducido por el IGF-1, en células Cos-1 transfectadas con la GRK2 (β ark), para conocer el papel del dímero $G\beta\gamma$ en este proceso.

6. Medir el estado de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducido por el IGF-1, en células Rat-1, tratadas con inhibidores del receptor del EGF, metaloproteasas y del ligando HB-EGF, para determinar su participación en este proceso.

7. Conocer el efecto del IGF-1 en la internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico humano etiquetado con la proteína verde fluorescente, con ayuda de la técnica de microscopia confocal

IX. 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 (-) -noradrenalina, el factor de crecimiento similar a insulina 1, y los reactivos de uso general fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. El LY 294002, la wortmanina, la toxina mutante de la difteria (CRM 197), el Ro 318220 y la estaurosporina 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. La *toxina pertussis* se purificó en el laboratorio de la vacuna concentrada como está descrito en (García-Sáinz, et, al, 1992). Las membranas de nitrocelulosa fueron obtenidas de Bio-Rad.

El BB-94 (Batimastat) fue proporcionado generosamente por el Dr. Mobashery (Michigan University, Mayne. USA). Las columnas de purificación de ADN fueron obtenidas de Qiagen. Los anticuerpos Anti-GRK2 y los anticuerpos anti-p85 de la PI3K son de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios fueron obtenidos de Zymed. Los reactivos de quimioluminiscencia fueron obtenidos de Pierce. El anticuerpo contra el decapeptido del carboxilo terminal de la secuencia del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster fue obtenido por la inmunización de conejos con el péptido indicado, obtenido de Multiple Peptide System (Vázquez-Prado, et, et, 1997). El anticuerpo contra la proteína verde fluorescente fue

obtenido en el laboratorio, generado con una proteína de fusión GST-EGFP. La proteína purificada se utilizó como antígeno para inmunizar conejos y se obtuvieron anticuerpos anti-EGFP útiles para realizar experimentos de inmunoprecipitación (Colín -Santana, Tesis de Licenciatura, 2005).

LINEAS CELULARES

Para realizar este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: células Rat-1, las cuales son derivadas de fibroblastos de pulmón de rata, células DDT1MMF, las cuales son derivadas de musculo liso de hámster, y células Cos-1, que son derivadas de fibroblastos de riñón de mono.

Las células Rat-1 que expresan por transfección estable al receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster, fue donada por el grupo del los Dres. R. J. Lefkowitz y M. G. Caron (Duke University Medical Center). Las células Rat-1 que expresan establemente al receptor α_{1b} -adrenérgico humano etiquetado en el carboxilo terminal con la proteína GFP, las genere en el laboratorio como se describe más adelante. Las células DDT1MF2 y COS-1 fueron obtenidas del ATCC. Todas las celulares fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glutamina y con una concentración de glucosa de 4.5g/L. Fueron complementadas con: suero fetal de bovino al 10% (SFB) y los antibióticos: estreptomina 100 μ g/ml, penicilina 100 U/ml, anfotericina B 0.25 μ g/ml y G418 300 μ g/ml como antibiótico de selección (solo para las células Rat-1). Las células fueron cultivadas dentro de una incubadora a 37 °C en una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂.

CONSTRUCCION DEL PLASMIDO α_{1b} -H-ADRENERGICO-GFP

El Dr. Gozoh Tsujimoto (Department of Genomic Drug Discovery Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan) generosamente nos donó el plásmido pME-18S que codifica la expresión del receptor α_{1b} -adrenergico humano. El gen del receptor fue secuenciado y amplificado por PCR y el producto fue subclonado dentro del plásmido pDrive. Los cebadores usados fueron los siguientes: el sentido: 5'GGAAGATCTCCACCATGAATCCCGACCTGGACACCG3'

y el antisentido: 5'CCGGAATTCCAAACTGCCCGGGCGCCAG3'. El producto α_{1b} - Δ stop fue insertado dentro de los sitios BglIII/EcoRI del vector pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA) para generar un receptor flanqueado en el carboxilo terminal con la proteína verde fluorescente (GFP).

Se realizó la secuenciación de doble cadena de DNA en la Unidad de Biología Molecular de nuestro instituto para verificar la secuencia de nucleótidos correcta del plásmido usado.

EXPRESION DE PLASMIDOS EN LAS LINEAS CELULARES

La transfección transitoria en las células Cos-1 se realizó por el método de DEAE-dextran (González, et, al, 1995). Las células con un 90% de confluencia fueron transfectadas con un total de 6 μ g del plásmido para cada caja Petri de 10 centímetros de diámetro, usando 3 μ g del plásmido que contiene los cDNA del α_{1b} -adrenérgico y 3 μ g del plásmido que contiene los cDNAs que codifica para el carboxilo terminal de la cinasa del receptor β -adrenérgico (β ARK), el tipo silvestre de la PI3K (PI3Kwt), la mutante dominante negativa de la PI3K, (Δ p85) o la β -galactosidasa (pCH110). Los experimentos se realizaron con las células transfectadas después 48 horas del proceso de transfección. La eficiencia de transfección (~60%) fue determinada por la actividad de la β -galactosidasa. La expresión de proteínas de interés se verificó tanto por el análisis de Western blot como por ensayo de unión al ligando radiactivo [3 H]-prazosina. El cDNA del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster (Cotecchia, et, al, 1998), fue amablemente donado por el Dr. Robert J. Lefkowitz, el cual fue subclonado en el vector pcDNA3. Los plásmidos SRa-p85 que contiene el cDNA de la subunidad silvestre de la p85 y de la Δ p85 que contienen el cDNA de la subunidad p85 α mutante de la dominante negativa de la PI3K, la cual carece del sitio activo para la subunidad p110, fue proporcionado amablemente por los Drs. W. Ogawa y M. Kasuga (Hara, et, al, 1994). El plásmido pRK5 que expresa al carboxilo terminal de la GRK2 ($\beta\gamma$) de la β ARK fue donado amablemente por el Dr. W. Koch (Koch, et, al, 1994).

Las células Rat-1 fueron transfectadas con el cDNA del receptor α_{1b} -adrenergico humano- fusionado en su carboxilo terminal con la proteína verde fluorescente, como se describe a continuación. La transfección se realizó con lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente las células fueron seleccionadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glutamina y con una concentración de glucosa de 4.5g/l. Fue complementado con: suero fetal de bovino al 10% (SFB), los antibióticos: estreptomicina 100 μ g/ml, penicilina 100 U/ml, anfotericina B 0.25 μ g/ml y con G418 a una concentración de 900 μ g/ml como antibiótico de selección. Algunas clonas fueron aisladas y posteriormente se midió el incremento en la concentración de calcio intracelular para conocer la respuesta α_{1b} -adrenergica. La clona con la mejor respuesta fue seleccionada para este trabajo.

PREPARACION DE MEMBRANAS

Las células confluentes se lavaron dos veces con buffer salino (PBS), después se les adicionó 1 ml de buffer (HEPES 20 mM, pH: 7.5, EDTA 5 mM pH: 8.0, $MgCl_2$ 2mM, β -glicerofosfato 10 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Na_3VO_4 5 100 μ M, leupeptina 20 μ g/ml; aprotinina 20 μ g/ml, fluoruro de fenil-sulfonilo (PMSF) 100 μ g/ml y de inhibidor de tripsina de soya 50 μ g/ml a pH 7.4 final). Las cajas de cultivo se mantuvieron con esta solución sobre hielo durante 1 hora. Posteriormente las células se despegaron con un gendarme y se pasaron a un homogenizador de vidrio-teflón con vástago y fueron homogenizadas con 40 golpes con taladro sobre hielo. El homogenado obtenido se pasa a tubos corex y se centrifuga a 1500x g en el rotor SS34, de la centrifuga Sorval durante 20 min a 4° C. El sobrenadante se separa y la pastilla se re-homogeniza en 10 ml de buffer de lisis. El homogenado se pasa a tubos Corex fríos y se centrifuga a 1,500 g en el

rotor SS34, durante 20 minutos a 4° C. La pastilla obtenida, que contenía a las membranas, se resuspendió en una solución amortiguadora de Tris-MgCl₂ (Tris 50 mM, MgCl₂ pH: 7.5). La concentración de las proteínas fue determinada por el método de Lowry.

ENSAYO DE UNION AL LIGANDO

Los estudios de unión a ligando fueron hechos en membranas previamente aisladas. Las membranas fueron incubadas con diferentes concentraciones de [³H] Prazosina dentro de un rango de (0.025-8 nM). La concentración de proteína usada fue de 100 µg de en un volumen final 0.25 ml de buffer de unión (Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.5). La reacción fue incubada durante 60 minutos a 37 °C en un baño con agitación. La reacción fue terminada, agregando 5 ml de buffer de unión frío y filtrando las muestras a través de filtros GF/C en un cosechador de células Brandel. Los filtros se lavaron 2 veces y fueron secados. Posteriormente se pasaron a viales, a los que se les agregó líquido de centelleo y fueron puestos en un contador para medir la radioactividad. La unión inespecífica fue determinado en presencia de 10 µM de fentolamina. La unión específica fue de >90% del pegado total a la K_D. El programa EBDA (Biosoft-Elsevier) fue usado para analizar las curvas de saturación.

ENSAYO DE FOTOMARCAJE DEL RECEPTOR α_{1b}-ADRENERGICO-GFP

Las membranas de las células Rat-1α_{1b}-h-GFP, (250 µg proteína), fueron resuspendidas en buffer de fotomarcage: (Tris-HCl, 50 mM, NaCl, 1.5m, EDTA 500 mM, MgCl₂ 10 mM). Las células fueron incubadas 1 hora a 37° C en agitación. La reacción se detiene agregando 0.7 ml de buffer de fotomarcage. Posteriormente los lisados fueron incubados en la obscuridad con 6 nM de [¹²⁵I-aryl]-azido-prazosina y expuestos a luz UV como esta descrito, (Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). Después de este tratamiento las membranas fueron centrifugadas 15 minutos a 13,000 rpm en una micro centrífuga Eppendorf a 4° C. El pellet se solubilizo en buffer de fotomarcage con SDS 10% y tritón 10 %, durante 1 hora en hielo. Pasado el tiempo de solubilización las muestras fueron

centrifugadas por 15 minutos en una micro centrífuga Eppendorf a 13000 rpm y el sobrenadante fue inmunoprecipitado toda la noche a 4° C. Los sobrenadantes de las muestras fueron transferidos a tubos Eppendorf nuevos, que contenían 5 µl del anticuerpo generado contra el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster o 10µl contra la proteína verde fluorescente, y se le adicionaron además 20 µl de proteína A-seferosa. Se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, las esferas de seferosa fueron lavadas tres veces por resuspensión-centrifugación, con solución amortiguadora de: Hepes 100 mM, NaHPO₄ 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 2X y fueron calentadas 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 desnaturalizantes. Una vez corridos geles fueron secados y expuestos sobre una placa del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics y después fueron analizados con el software Image Quant.

FOSFORILACION DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO

Las células fueron crecidas en placas de cultivo de 6 pozos a confluencia, dejando en ayuno sin fosfatos un día antes del experimento. El día del experimento las células fueron incubadas con 2 ml de este mismo medio que contenía el [³²P]Pi, 50µCi /ml para las células Rat-1 α_{1b} -, 75µCi para las células Cos-1 y 150 µCi para las células DDT1MF2, durante 3 horas a 37 °C. Las células marcadas metabólicamente se estimularon con IGF-1 o con algún otro agente como se indica en cada experimento. Posteriormente se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos-salino (PBS) fría y fueron resuspendidas en 500 µl de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; SDS 0.1%; tritón 1%; NaF 50 mM; Na₃VO₄ 100µM; β-glicerofosfato 10mM; Na₄P₂O₇ 10mM; p-Serina 1mM; p-Tirosina 1mM; 1mM p-Treonina 1mM; EDTA 5mM; leupeptina 20 µg/ml; aprotinina 20 µg/ml, fluoruro de fenil-sulfonilo (PMSF) 100 µg/ml y de inhibidor de tripsina de soya 50 µg/ml a pH 7.5 final) por una hora sobre hielo. Los extractos fueron colectados y centrifugados a 10,000 xg o 13,000 rpm por 15 minutos en una micro centrífuga Eppendorf.

Los sobrenadantes de las muestras fueron transferidos a tubos Eppendorf nuevos, que contenían 5 µl del anticuerpo generado contra el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster o 10µl contra la proteína verde fluorescente, y se le adicionaron además 20 µl de proteína A-sefarosa. Se incubaron toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente, las esferas de sefarosa fueron lavadas tres veces por resuspensión-centrifugación, con solución amortiguadora de: Hepes 50 mM, NaCl 100mM, NaHPO₄ 50 mM, NaF 10 mM, Tritón 10 %, SDS 1 % a pH:7.2 (solución de lavado). A las esferas lavadas se les agregó solución de Laemmli 2X y fueron calentadas 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 desnaturalizantes. Una vez corridos geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa y expuestos sobre una placa del sistema PhosphorImager de Molecular Dynamics y después fueron analizados con el software Image Quant, para la cuantificación de la fosforilación. Las membranas posteriormente fueron sujetas a ensayos de Western Blot, como se describe a continuación.

WESTERN BLOT

Las membranas de nitrocelulosa fueron hidratadas en una solución de TBS (NaCl. 150 mM, Tris-HCL 100 mM, pH: 8.0).Después, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas en una solución de TBS-Tween .0.1 %-leche 3%, durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente a las membranas de nitrocelulosa se les adicionó una solución de TBS-Tween 0.1%-leche 1.5 % con el anticuerpo contra el carboxilo terminal del receptor (dilución 1:500). Las membranas de nitrocelulosa se dejaron incubando con esta solución toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas se lavaron con una solución de TBS-Tween 0.1%, tres veces en agitación durante 5 minutos para cada lavado. Después de los lavados las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la peroxidasa a una dilución de 1:10000, en una solución de TBS-Tween 0.1%-leche 1.5 %.

La incubación se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo incubación, las membranas se lavaron con una solución de TBS-Tween

0.1%, tres veces en agitación durante 5 minutos para cada lavado. Para finalizar, las membranas fueron puestas en contacto con los reactivos de quimioluminiscencia. Las membranas se exponen en un casete con placas de autorradiografía y se revelan. Las placas ya reveladas son escaneadas y las imágenes son procesadas en el Adobe Photoshop.

CUANTIFICACION DE $[Ca^{2+}]_i$

Las células Rat-1 α_{1b} , al 100% de confluencia se incubaron toda la noche con medio DMEM sin suero ni antibióticos en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. Al día siguiente las células fueron cargadas con el fluoróforo FURA 2AM [$5\mu M$] en 5 ml de una solución 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), durante 45 minutos a $37^\circ C$ 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 0.3% durante 1 minuto, pasado este tiempo fueron resuspendidas en medio Krebs-Hepes-Glucosa-BSA con $CaCl_2$ 1.3 mM 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 suavemente en 10 ml de Krebs-Hepes-Glucosa-BSA. Una vez hecho los lavados, las células fueron preincubadas 15 min en presencia del IGF-1 (100 ng/ml) a temperatura ambiente en agitación suave. Pasado este tiempo la movilización de calcio intracelular se observó después de la estimulación con la noradrenalina ($10\mu M$), mediante cambios en la fluorescencia. Las células se mantuvieron en agitación constante y se utilizó un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie 2, el cual registra la fluorescencia con excitación a 340 nm y a una emisión de 510 nm del fluoróforo. La movilización del $[Ca^{2+}]_i$ 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 $[Ca^{2+}]_i = K_d [(R-R_{min}) / (R_{max}-R)] [Sf_2/Sb_2]$, 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 (500mM) y $R_{máx}$ es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Tritón-X-100 al 10%. Sf_2 y Sb_2 son los coeficientes de proporcionalidad del fluoróforo libre (Sf_2) y el unido al calcio (Sb_2) en la longitud de onda 2 (Grynkiewicz, et al., 1998).

CUANTIFICACION DE FOSFATOS DE INOSITOL TOTALES

Las células Rat1- α_{1b} fueron sembradas en placas de seis pozos con medio DMEM complementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos-antimicóticos, dejando que llegaran a una confluencia del 90%. Se marcaron 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 radioactivo 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, KH_2PO_4 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, Hepes 20 mM, $CaCl_2$ 1.27 mM, 20 mM pH 7.4), durante 20 min a 37 °C. Posteriormente las células fueron preincubadas con el IGF-1 (100 ng/ml) durante 15 minutos. Pasado este tiempo las células fueron estimuladas con noradrenalina (10 μ M), durante 5 minutos. La estimulación fue detenida aspirando el medio y agregando 2 ml de cloroformo:metanol (2:1) en frío dejando reposar sobre hielo durante 20 minutos, posteriormente se recuperó el lisado celular de las placas y se transfirieron 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 las mezclas 10 minutos a 3000 rpm en una centrífuga clínica. Se tomó la fase acuosa para separar los fosfatos de inositol totales (IPs), por cromatografía de intercambio aniónico en columnas de Dowex AG1-X8 en donde las muestras fueron eluidas como esta descrito (García-Saíenz, et al, 2004).

Las desintegraciones por minuto (DPM) de las fracciones colectadas se obtuvieron en un contador de centelleo Beckman, y se analizaron los datos con el programa

Prisma 4.0 Graph pad. Los análisis estadísticos usados para la comparación de los grupos fue Analisis de Varianza seguido de la prueba de Newman-Keuls y se efectuó con el software Prisma 4.0 Graph Pad.

ESTUDIOS DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células se crecieron en cajas petri con fondo de cristal y mantenidas en medio de ayuno 12-14 hrs. Las células fueron estimuladas mientras las imágenes eran capturadas. Las imágenes se obtuvieron con un equipo confocal Bio-Rad MCR 1024 (Bio-Rad Hercules,CA) acoplado a un microscopio de luz invertido TMD 300 Nikon Diaphot. Se utilizó un objetivo de inmersión en glicerol 100x/1.3 NA. La proteína verde fluorescente fue excitada usando un laser de argón/kriptón a 488 nm y la fluorescencia emitida se detecto a 515 - 540 nm. Todas las imágenes fueron obtenidas con una apertura numérica de 1.3, el mismo porcentaje de láser, la misma apertura de iris y la misma ganancia. Las imágenes se procesaron y convirtieron a formato TIFF con el programa Confocal Assistant 4.2

X. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis fueron publicados en:

*Molecular Endocrinology. (2006).20 (11):2773-2783

** European Journal of Pharmacology. (2008). 578, 1-10

***SECCION I DE RESULTADOS**

Al estimular al receptor del IGF-1 se induce la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico.

Para conocer si el IGF-1 induce una fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, los fibroblastos de Rat-1, que expresan de forma endógena a los receptores del IGF-1 y transfectados establemente a los receptores α_{1b} -adrenérgicos. Se realizó una curva dosis respuesta y una curva curso-temporal de la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. El IGF-1 induce un aumento claro en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico dependiente de la concentración, el aumento máximo fue de 3 veces con un valor de EC_{50} de 1.3 ± 2 ng/ml (Figura 9). El curso temporal indica que el efecto de fosforilación es rápido, siendo observado claramente ya a los 2 minutos después de adicionar el IGF-1. La fosforilación alcanza una meseta entre los 10-30 minutos, y disminuye a los 60 minutos (Figura. 10). En ambas figuras se muestra una autoradiografía representativa del western blot, que muestra el cargado total de la proteína.

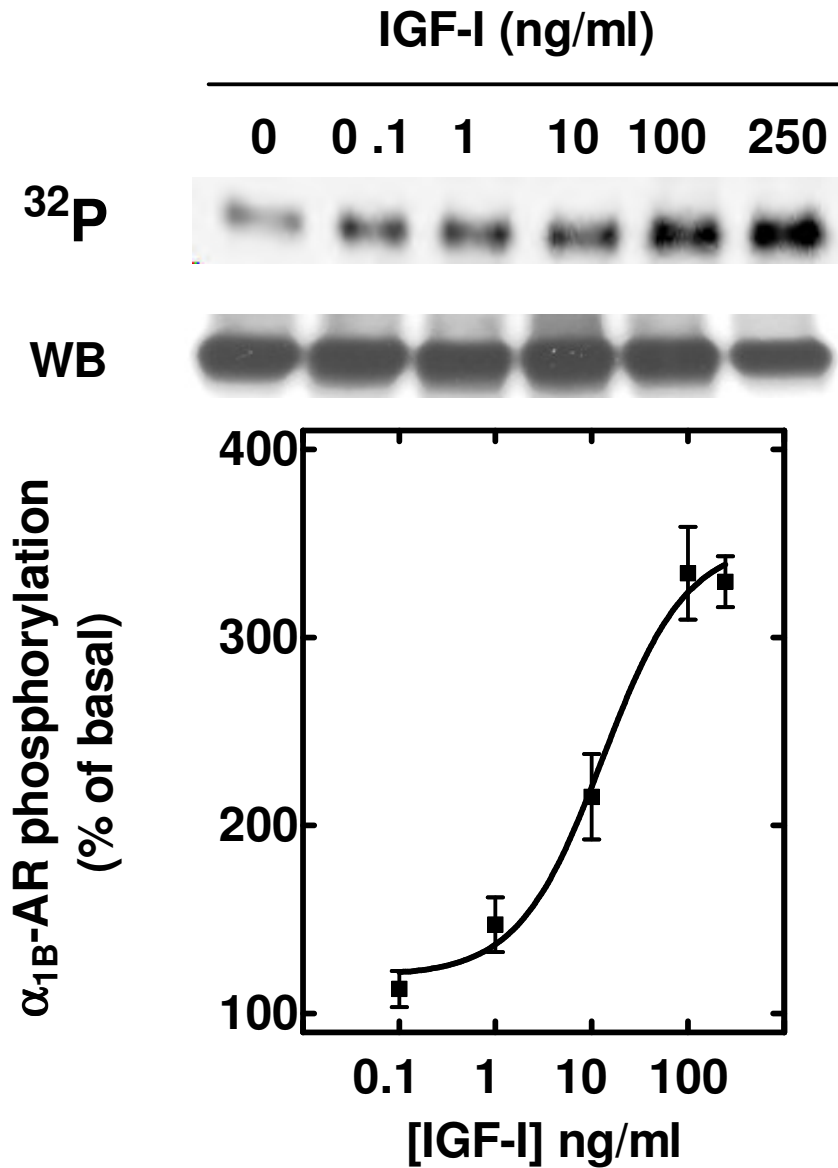


FIGURA. 9. EL EFECTO DEL IGF-1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENÉRGICO EN LOS FIBROBLASTOS RAT-1. Se muestra a curva dosis respuesta de fosforilación inducida por diferentes concentraciones del IGF-1. Las células fueron incubadas durante 15 min en presencia de las concentraciones indicadas del IGF-1. En la gráfica se muestra el promedio y el error estándar de 4-5 experimentos independientes. Una autorradiografía representativa es mostrada de la ³²P y de la inmunoprecipitación por Western blot.

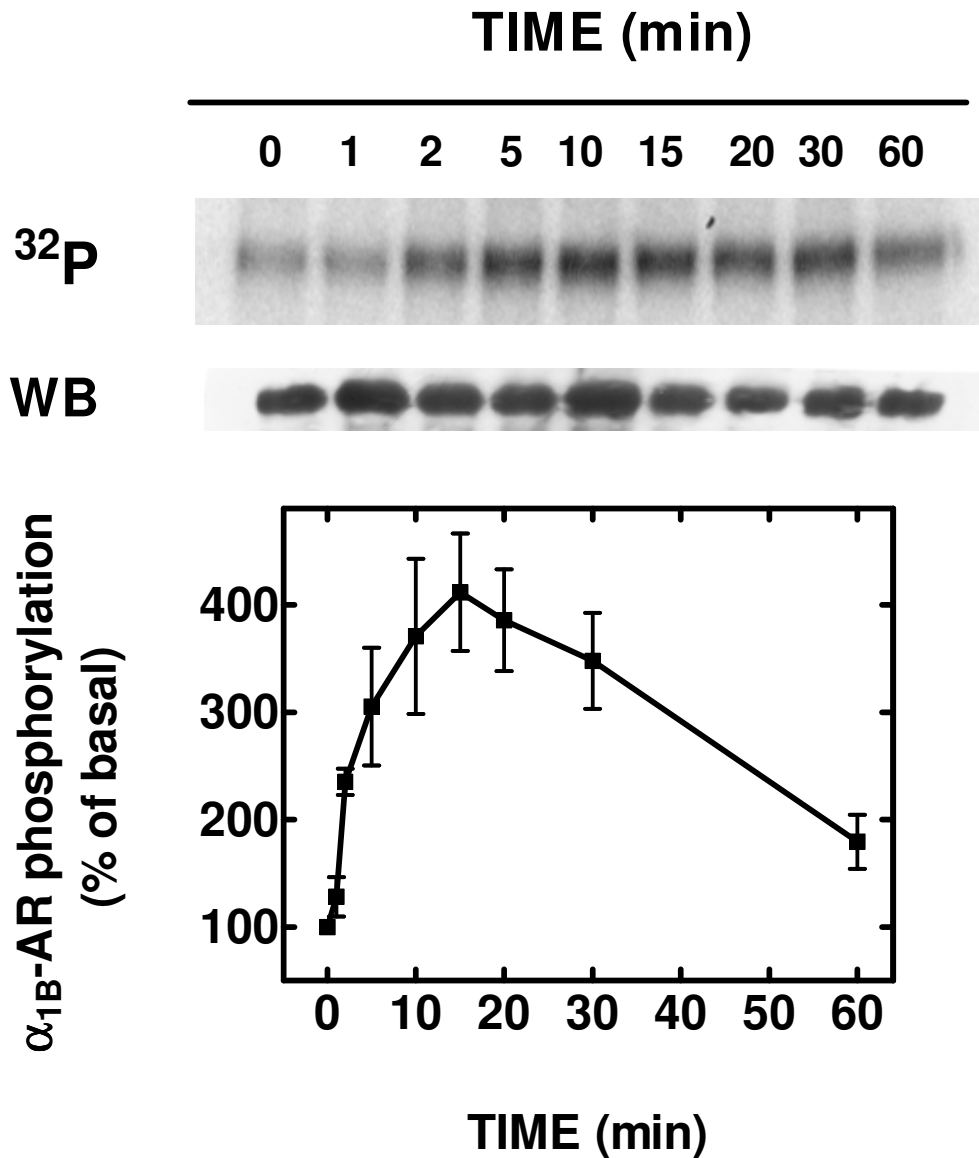


FIGURA. 10. EL EFECTO DEL IGF-1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR α_{1B} -ADRENÉRGICO EN LOS FIBROBLASTOS RAT-1. Se muestra a curva curso-temporal de fosforilación inducida por el IGF-1. Las células fueron incubadas con 100 ng/ml del IGF-1, durante los tiempos indicados. En la gráfica se muestra el promedio y el error estándar de 4-5 experimentos independientes. Una autoradiografía representativa es mostrada de la ³²P y de la inmunoprecipitación por Western blot.

El IGF-1 promueve la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico.

Las consecuencias funcionales del IGF-1 en la acción de los receptores α_{1b} -adrenérgicos fueron examinadas. Se observó que el IGF-1 promovió un pequeño (no significativo) aumento en la producción de fosfatos de [3 H] inositol (Figura 11). La noradrenalina aumentó notablemente la producción de fosfatos de [3 H] inositol y esta producción fue disminuida claramente con el pretratamiento con el IGF-1. (Figura 11)

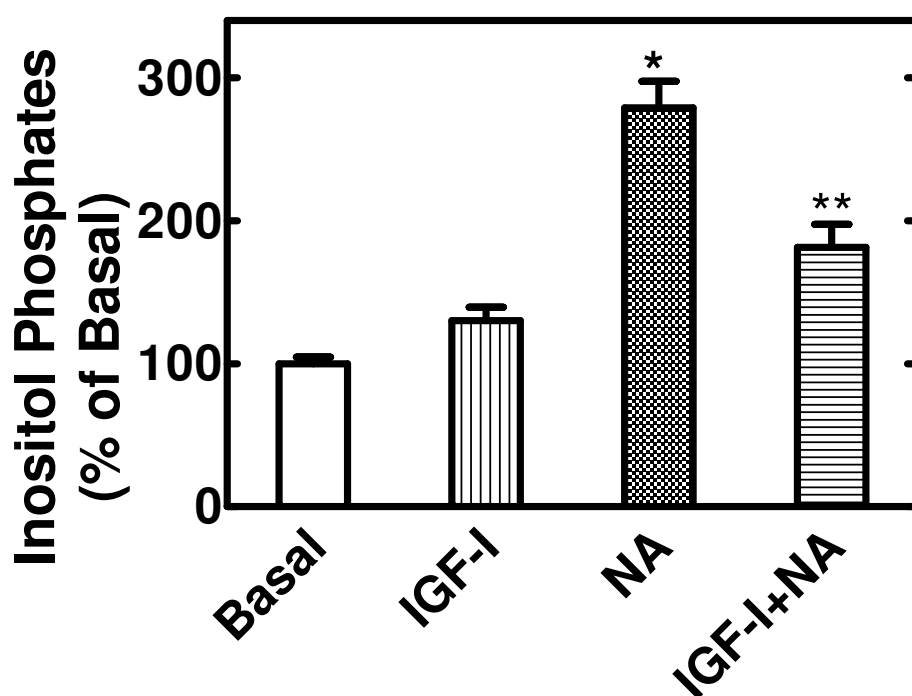


FIGURA 11. EFECTO DEL IGF-1 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE [3 H] INOSITOL EN LOS RECEPTORES α_{1b} -ADRENÉRGICOS: Para la determinación de fosfatos de [3 H]-inositol los fibroblastos Rat-1 que expresan a los receptores endógenos para el IGF-1 y los receptores α_{1b} -adrenérgico marcaron la noche anterior al experimento con [3 H]-mio-inositol en medio libre de inositoles para al día siguiente incubarlos en ausencia de cualquier agente (Basal), en presencia de IGF-1 100 ng/ml (IGF-1), de noradrenalina 10 μ M (NA), o con ambos agentes (IGF-1 + NA). La gráfica muestra los promedios y los errores estándar de 5 experimentos independientes. * $p < 0.001$ vs. el basal , ** $p < 0.001$ vs. la noradrenalina sola.

El efecto en la movilización del calcio intracelular fue determinado y se observó que el IGF-1 no produce cambios sobre el nivel basal (Figura. 12). La noradrenalina indujo un aumento inmediato de la liberación de calcio intracelular, que después de unos segundos empezó a disminuir hacia los niveles basales (Figura. 12). Cuando las células fueron pretratadas 15 minutos con el IGF-1 y estimuladas con la noradrenalina, la acción de la noradrenalina sobre el receptor adrenérgico fue disminuida notablemente (Figura. 12). Tal acción no fue debida a una perturbación general del proceso de señalización de calcio como es mostrado por la capacidad del ácido lisofosfatídico de aumentar la concentración de calcio intracelular de una forma inmediata y muy marcada (Figura 12).

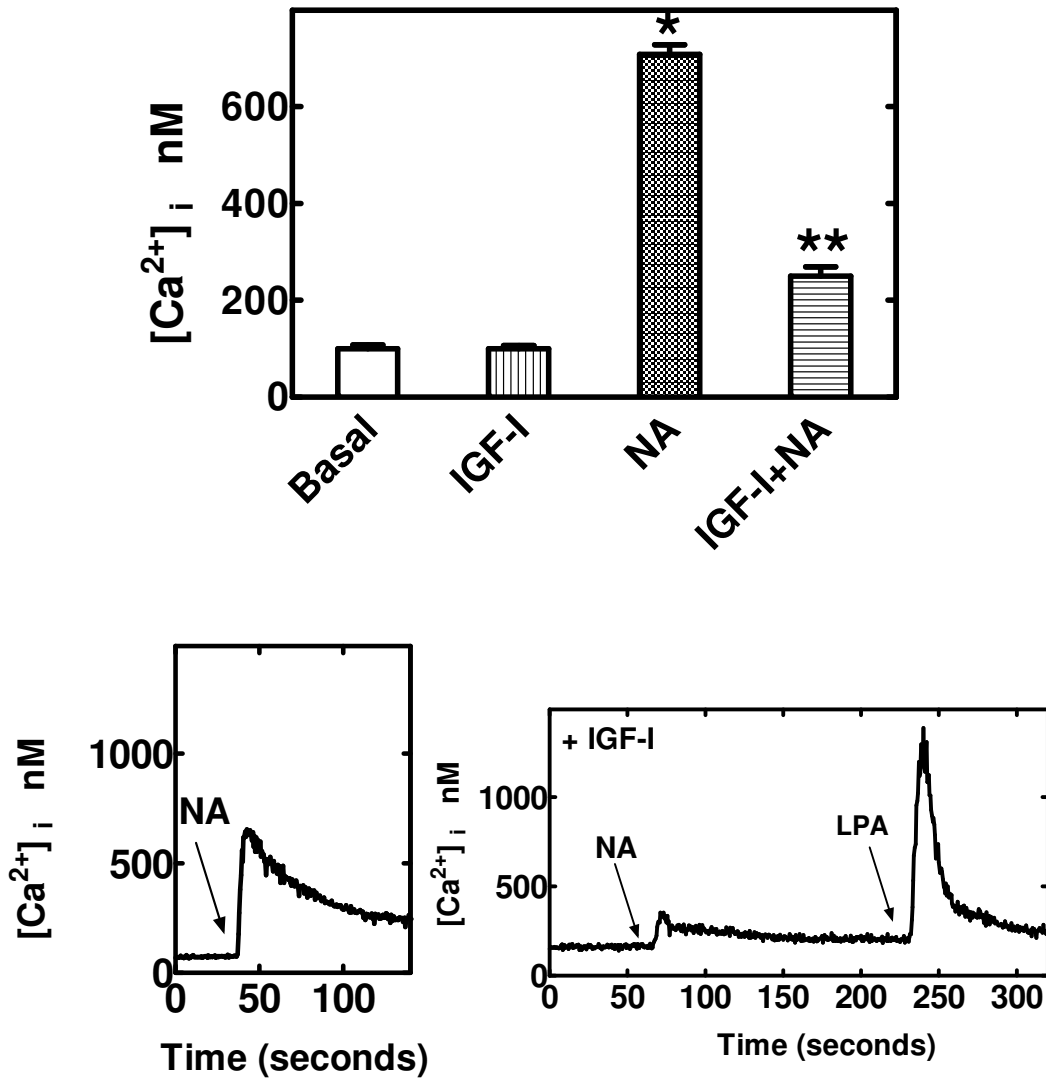


FIGURA 12. EFECTO DEL IGF-1 SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE [Ca²⁺] INTRACELULAR EN LOS RECEPTORES α_{1b} -ADRENÉRGICOS. *Panel superior:* Las células Rat-1 fueron preincubadas en ausencia o en presencia de IGF-1 100 ng/ml por 15min. (Tiempo 0); donde se indica se agregó noradrenalina 10 μ M (NA) o ácido. lisofosfatídico 1 μ M (LPA). *Panel inferior:* los trazos representativos de las células La gráfica muestra los promedios y los errores estándar de 5 experimentos independientes. * $p < 0.001$ vs. el basal , ** $p < 0.001$ vs. la noradrenalina sola.

Las proteínas Gi participan en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1.

El receptor del IGF-1 media algunas de sus acciones a través de la activación de las proteínas de G de la familia de Gi (Patel, 2004, Nishimoto, et al 1987). Por consiguiente, se probó si la fosforilación del receptor α_{1b} - adrenérgico estimulado con el IGF-1 era sensible a la acción de la *toxina pertussis*. Como muestra en la (Figura. 13) el efecto de IGF-1 disminuyó significativamente la fosforilación del receptor α_{1b} - adrenérgico en las células tratadas con la *toxina pertussis* .El efecto de noradrenalina en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrénergico no fue alterada significativamente por el pretratamiento con la *toxina pertussis* y el efecto del ácido lisofosfatídico fue notablemente reducido (Casas, et al, 2000, Vázquez-Prado, et al, 1997) los cuales sirvieron como controles negativo y positivo respectivamente (Figura 13). Estos datos sugieren que las proteínas G sensibles a la toxina pertussis participan también en la desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrénergico, inducida por los receptores del IGF-1.

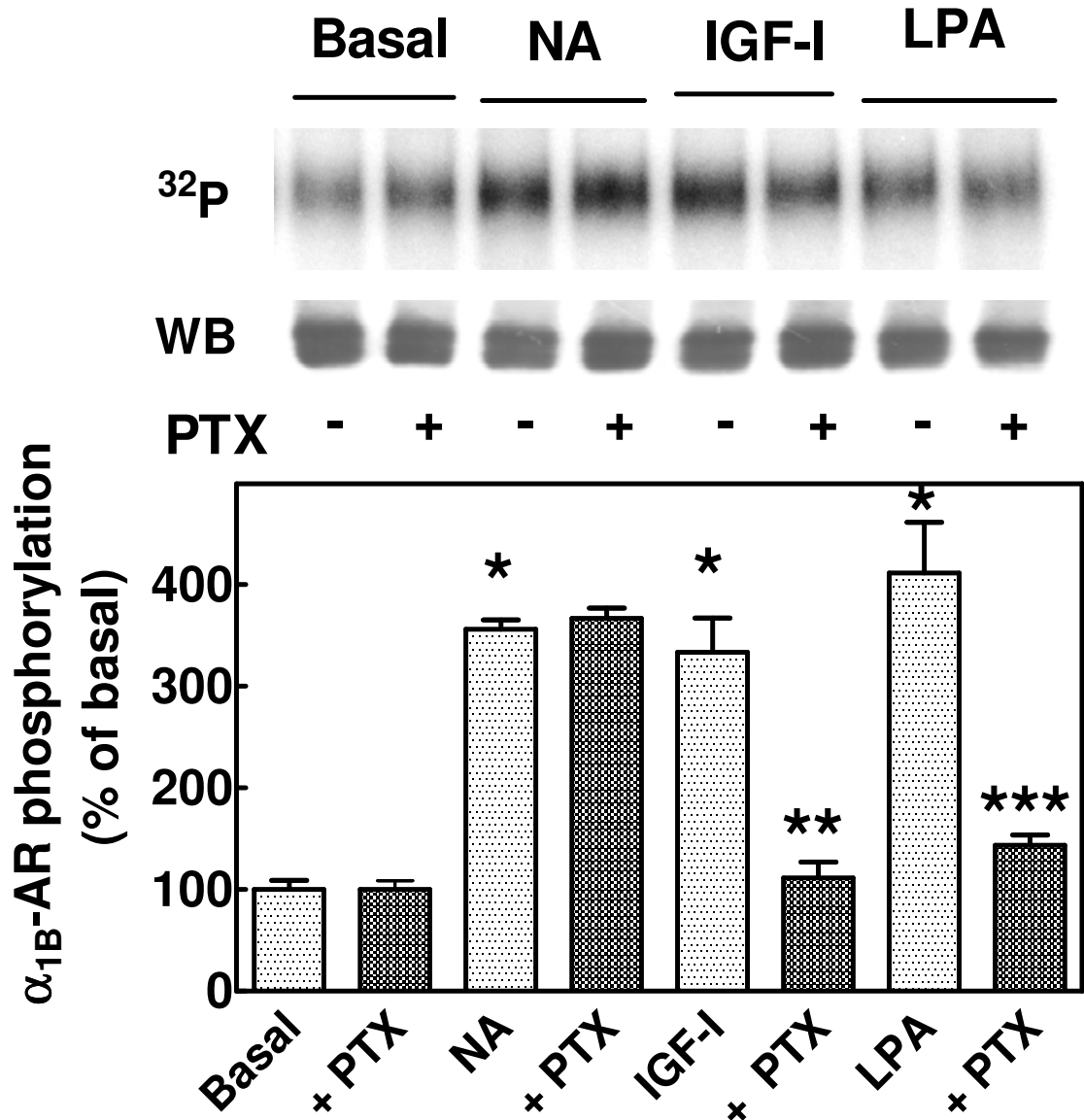


FIGURA 13. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA FOSFORILACION DEL RECEPTOR α_{1b} INDUCIDA POR EL IGF-1 .: Los fibroblastos fueron preincubados por 12 hrs. en la ausencia (barras punteadas) o en la presencia (barras cruzadas) de *toxina pertussis* 100 ng/ml y estimuladas con noradrenalina 10 μ M (NA), con IGF-1 100 ng/ml o con ácido lisofosfatídico 1 μ M (LPA). La gráfica muestra los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar de 4-5 experimentos empleando diferentes preparaciones de células. El nivel basal de fosforilación no fue afectado por el tratamiento con *toxina pertussis*. * $p < 0.01$ vs. El basal; ** $p < 0.001$ vs. El IGF-1 solo; *** $p < 0.001$ vs. El ácido lisofosfatídico solo. Una autorradiografía representativa es mostrada de la ^{32}P y de la inmunoprecipitación por Western blot.

Tomando en cuenta estos resultados, se probó la posibilidad de que la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico estimulado por otros receptores endógenos con actividad de cinasa de tirosina, también podría involucrar a las proteínas G sensibles a la *toxina pertussis* y de hecho éste fue el caso. Como se muestra en la (Figura. 14), las fosforilaciones del receptor α_{1b} -adrenérgico estimulado por la insulina, el EGF y el PDGF, fue disminuida significativamente en las células pretratadas con la *toxina pertussis*. Es importante mencionar que la *toxina pertussis* no bloquea totalmente el efecto de fosforilación por los factores de crecimiento, lo que indica que las proteínas G no son los únicos mediadores de este efecto y que la actividad de tirosina cinasa de estos receptores, así como la formación de los residuos de fosfotirosina en sus proteínas blanco, son parte importante de la regulación heteróloga de los receptores acoplados a proteínas G.

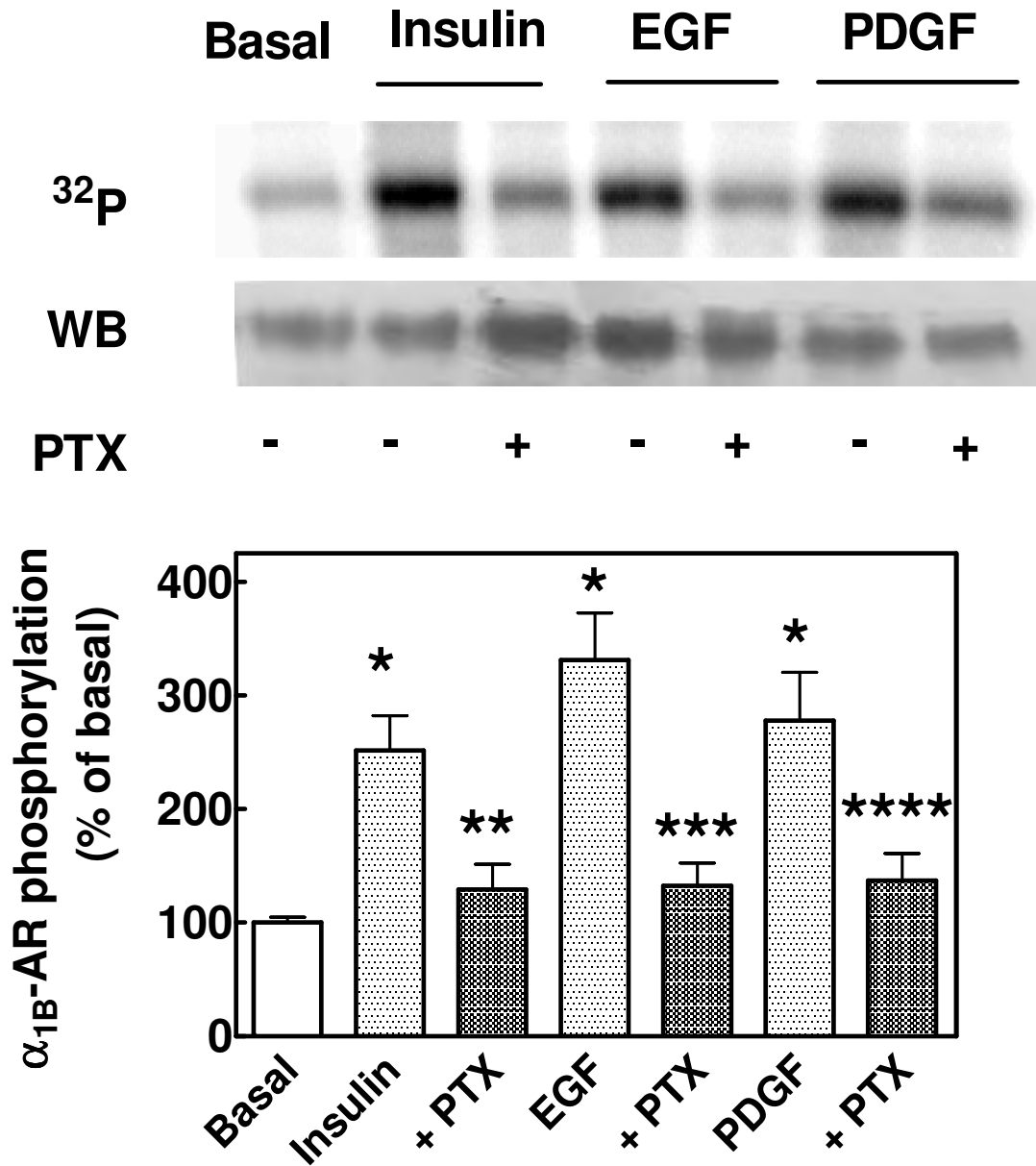


FIGURA 14. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA FOSFORILACION DEL RECEPTOR α_{1b} .INDUCIDA POR LA INSULINA, EGF Y PDGF .: Los fibroblastos Rat-1 fueron preincubados por 12 hrs. En ausencia (barras punteadas) o en presencia de *toxina pertussis* 100ng/ml (barras cruzadas) y retadas con insulina 100 nM, con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) 100 ng/ml ó con el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) 50 ng/ml. La gráfica muestra los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar de 4-5 experimentos usando diferentes preparaciones de células. * $p < 0.001$ vs el nivel basal; ** $p < 0.05$ vs. La insulina sola; *** $p < 0.01$ vs. el EGF solo; **** $p < 0.05$ vs. el PDGF solo. Una autoradiografía representativa es mostrada de la ^{32}P y de la inmunoprecipitación por Western blot.

Las metaloproteasas, el ligando HB-EGF y el receptor del EGF participan en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, a través de la activación de los receptores del IGF-1

La activación de las proteínas Gi por el receptor del ácido lisofosfátidico (LPA), induce la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico vía HB-EGF por las metaloproteasas, que lleva a la activación autocrina de los receptores de EGF, el cual lleva a la activación de la PI3K y de la PKC (Casas, et al, 2003). La posibilidad de que un proceso similar podría ser llevado a cabo por la acción del IGF-1 fue considerado y fue medido el papel de las metaloproteasas y de las proteínas cinasas a través del uso de inhibidores. El batimastat (BB-94), es un inhibidor de las metaloproteasas de espectro amplio. El tratamiento con este inhibidor disminuyó notablemente la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico estimulado por el ácido lisofosfatídico pero no por el EGF (Casas, et al, 2003). También se atenuó la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico estimulado con la noradrenalina lo cual fue observado por (Casas-González, et, al, 2006) (Figura. 15). De forma interesante, el efecto de IGF-1 con este inhibidor también fue disminuido (Figura. 15) lo qué sugiere que las metaloproteasas son parte importante del proceso de desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico.

El AG1478, un inhibidor selectivo de la actividad de la proteína cinasa de tirosina del receptor del EGF, disminuyó la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico estimulado por la noradrenalina (Casas-González, et al, 2006). Así como también disminuyó la fosforilación inducida por el EG. De forma interesante también la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1 disminuyó significativamente, lo cual hace pensar en la participación del receptor de EGF en la desensibilización heteróloga de receptor α_{1b} -adrenérgico. (Figura.16).

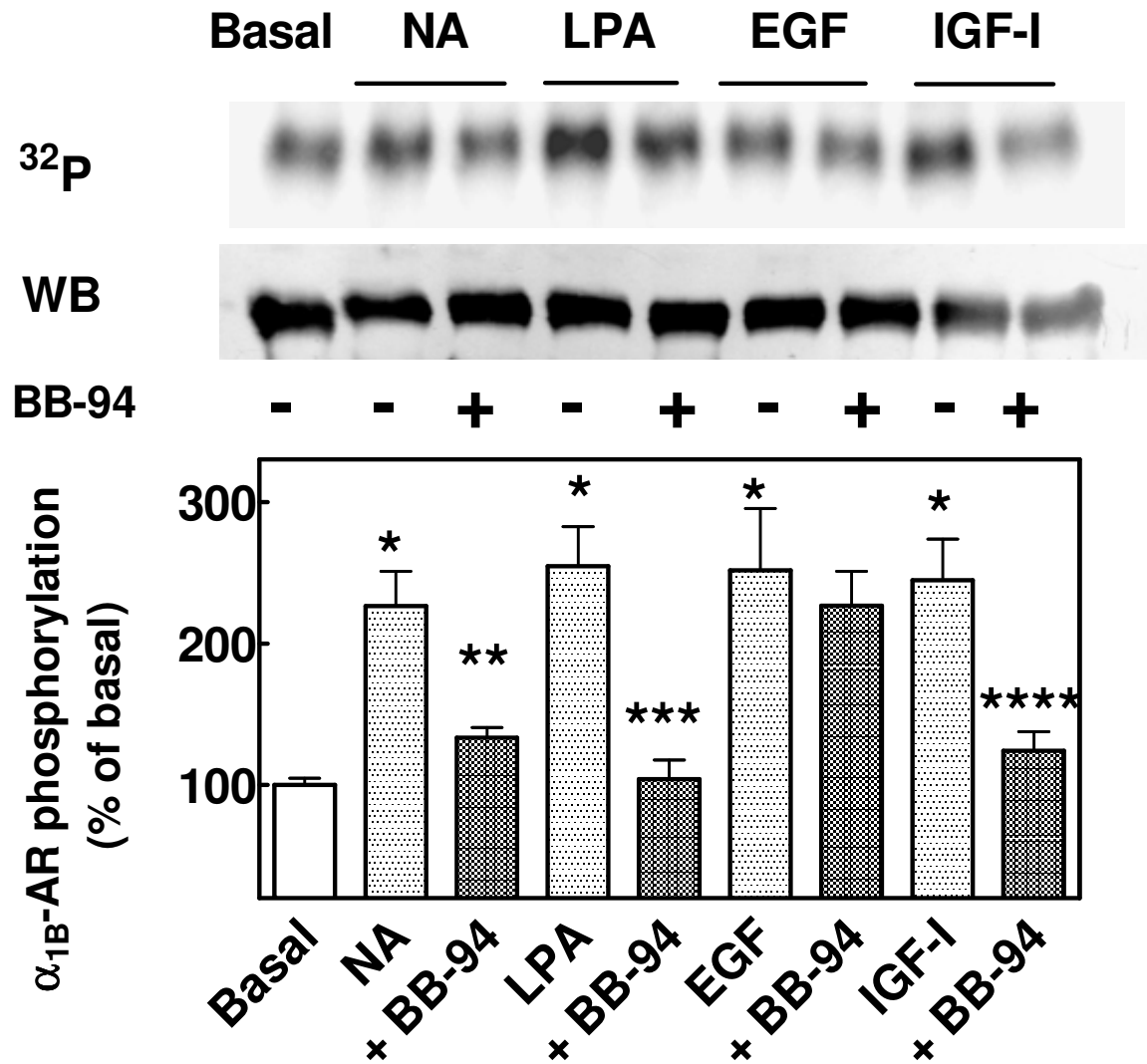


FIGURA.14. EL EFECTO DE LAS METALOPROTEASAS EN LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR α_{1b} .ADRENERGICO, INDUCIDA POR EL IGF-1. Los fibroblastos Rat-1 fueron incubados durante 30 min en usencia (barras punteadas) o en presencia del BB-94 10 μ M (Batimastat) (barras cruzadas) y fueron retadas con noradrenalina 10 μ M; con ácido lisofosfatídico 1 μ M (LPA); con EGF con IGF-1 100 ng/ml . La gráfica muestra los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar de 4-5 experimentos empleando diferentes preparaciones de células. El nivel basal del receptor α_{1b} -adrenérgico no fue afectado por el BB-94. * $p < 0.01$ vs el nivel basal; ** $p < 0.05$ vs la noradrenalina sola; *** $p < 0.01$ vs el ác. lisofosfatídico sólo; **** $p < 0.05$ vs. El IGF-1 solo. Una autoradiografía representativa es mostrada de la 32 P y de la inmunoprecipitación por Western blot.

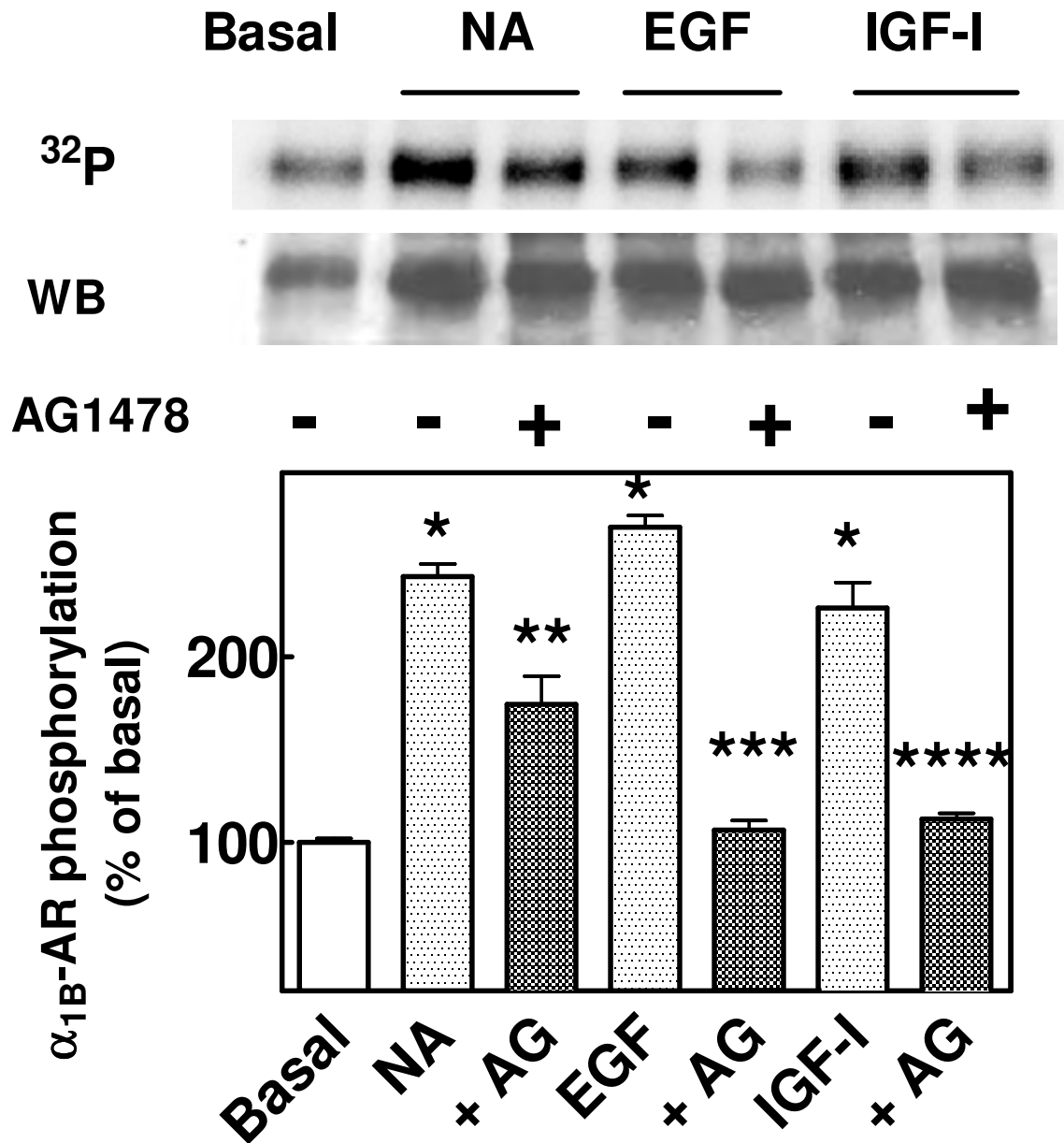


FIGURA.15. EFECTO DEL INHIBIDOR AG1478 EN LA FOSFORILACION DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO. Los fibroblastos Rat-1 α_{1b} -adrénergico de hámster fueron incubados por 30 min. En la ausencia (barras cruzadas) o en la presencia del AG1478 5 μ M y a continuación fueron retadas con noradrenalina 10 μ M (NA) 5 minutos, el EGF 100 ng/ml 15 minutos o con el IGF-1 100 ng/ml 15 minutos. El nivel basal del receptor α_{1b} -adrenérgico no fue afectado por el AG 1478 * $p < 0.001$ vs. El basal marcado; ** $p < 0.01$ vs la noradrenalina sola; *** $p < 0.001$ vs. el EGF sólo; **** $p < 0.001$ vs. El IGF-1 solo. Una autoradiografía representativa es mostrada de la ^{32}P y de la inmunoprecipitación por Western blot.

Para mostrar la participación del ligando, HB-EGF en éste mecanismo de regulación cruzada, utilizamos un anticuerpo neutralizante, el anti HB-EGF (Nishi and Klagsbrun, 2004). El anticuerpo neutralizante no afecto el estado de fosforilación basal ni tampoco la fosforilación inducida por ésteres de forbol (TPA) del receptor α_{1b} -adrenergico (Figura. 18). De forma interesante, el anticuerpo neutralizante anti HB-EGF disminuyó significativamente la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenergico, al ser estimulado con el IGF-1, lo que demuestra la participación del HB-EGF en la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico, a través de la activación del receptor del IGF-1 provocando la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. (Figura. 18)

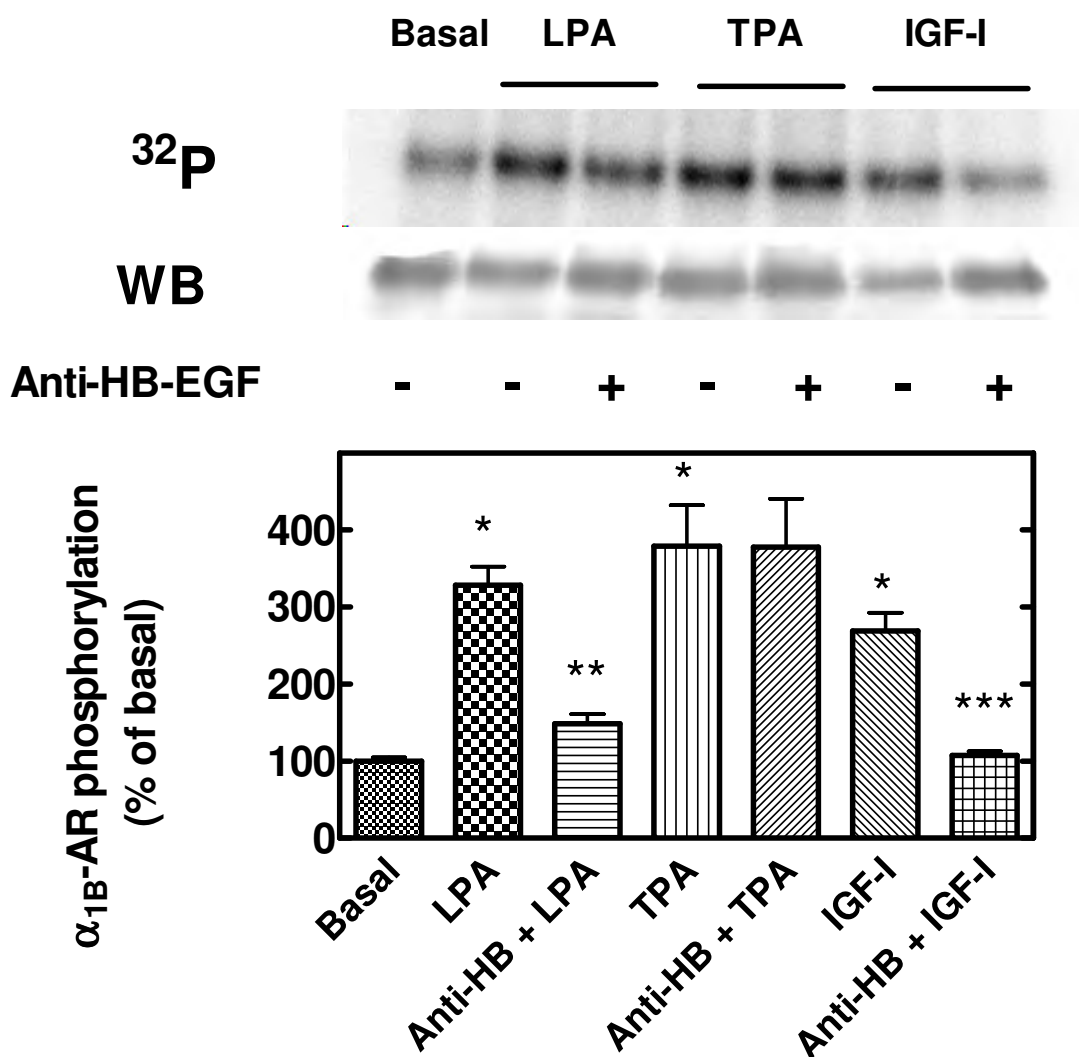


FIGURA 18. EFECTO DEL ANTICUERPO NEUTRALIZANTE HB-EGF EN LA FOSFORILACION DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO. Los fibroblastos Rat-1 que expresan al receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster, fueron incubados en ausencia y presencia de 5 μ g del anti HB-EGF, durante 15 minutos. Posteriormente fueron retadas con ácido lisofosfatídico 1 μ M (LPA) durante 5 minutos; con esteres de forbol (TPA) 1 μ M y con IGF-1 100 ng/ml durante 15 minutos. La gráfica muestra los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar de 4-5 experimentos empleando diferentes preparaciones de células. Se muestra una autoradigrafía representativa de la fosforilación del receptor y de la inmunoprecipitación por western blot. . * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.001$ vs ácido lisofosfatídico solo, *** $p < 0.01$ vs IGF-1 solo.

La proteína cinasa C y la fosfatidilinsitol 3 cinasa participan en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, a través de la activación de los receptores del IGF-1

De manera similar, los inhibidores de la PI3K, la wortmanina y el LY294002 e inhibidores de la PKC, la estaurosporina y el Ro 318220, inhibieron la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico estimulado por el IGF-1. Con estos datos se demuestra la participación de estas cinasas en el proceso desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico, inducida por la activación de los receptores del IGF-1 (Figura 17)

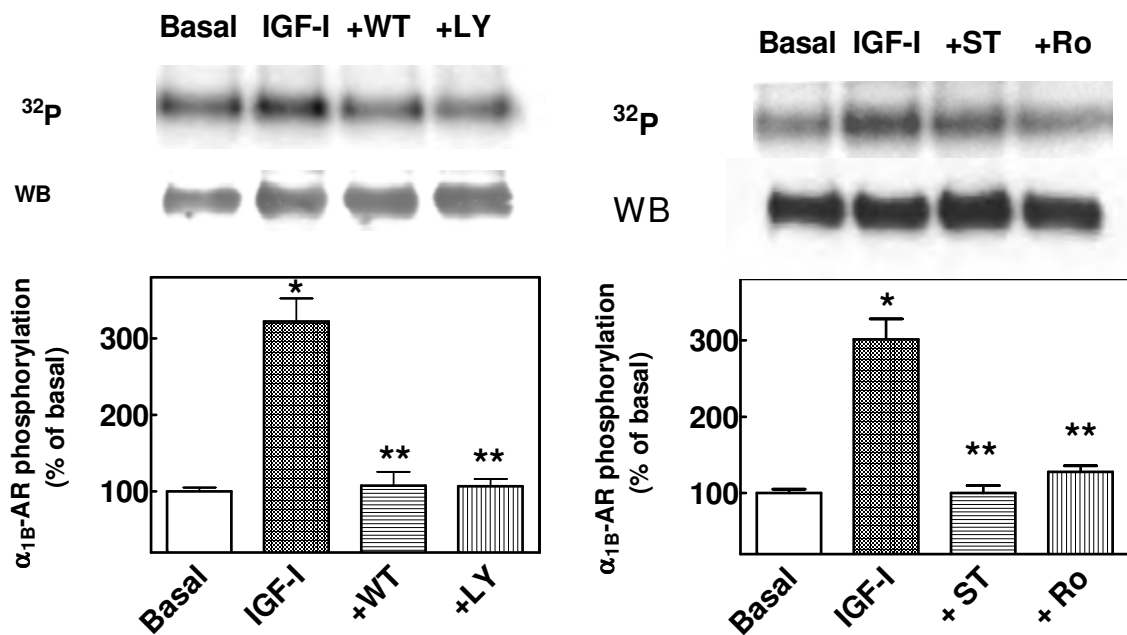


FIGURA.17. EL EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA PKC Y DE LA PI3K EN LA FOSFORILACION DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO. Las células Rat-1 que expresan al receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster, fueron incubadas por 30 min en la ausencia o en la presencia de 100 nM de wortmanina (+WT), 1 μ M de LY 294002 (+LY), 1 μ M de estaurosporina (+ST) o 1 μ M de Ro 318220 (+Ro), y fueron estimuladas con 100ng/ml del IGF-1 o el vehículo (Basal), durante 15 minutos. Los inhibidores no alteraron los niveles de la fosforilación basal del receptor α_{1b} -adrenérgico. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.01$ vs IGF-1 solo. Una autorradiografía representativa es mostrada de la ^{32}P y de la inmunoprecipitación por Western blot.

Participación del dímero Gβγ y de la fosfatidilinositol 3 cinasa en la fosforilación del receptor α_{1b}-adrenérgico a través de la activación de los receptores del IGF-1.

Para observar la participación del dímero Gβγ y confirmar la participación de la PI3K, se realizaron experimentos de cotransfección del cDNA del receptor α_{1b}-adrenérgico en las células Cos-1. Fue observada la expresión de los receptores α_{1b}-adrenérgicos en el rango de 1-1.5 fmol/mg de proteína en la membrana de estas células (datos no mostrados). Estos receptores son funcionales ya que producen fosfatos de [³H] inositol (datos no mostrados), además fueron susceptibles de fosforilación por la estimulación con la noradrenalina y el IGF-1. Pensamos que la disociación de las subunidades Gβγ de las proteínas G sensibles a la *toxina pertussis*, estarían participando en el mecanismo de transactivación que involucra al receptor de EGF, a través de: la activación de las metaloproteasas, las cuales liberan al ligando HB-EGF, provocando la transactivación del receptor de EGF. Para entender éste mecanismo se transfectó la región del carboxilo terminal de la proteína cinasa GRK2 (βARK). La βARK es una herramienta poderosa para estudiar el papel de las subunidades βγ de las proteínas G, ya que es capaz de secuestrar al dímero βγ (Koch, et al, 1994).

En las células cotransfectadas con la región del carboxilo terminal de la βARK y el cDNA del receptor α_{1b}-adrenérgico, la fosforilación del receptor α_{1b}-adrenérgico fue estimulada por la noradrenalina sin ser alterada, sin embargo, la fosforilación estimulada con el IGF-1 disminuyó notablemente (Figura. 19)

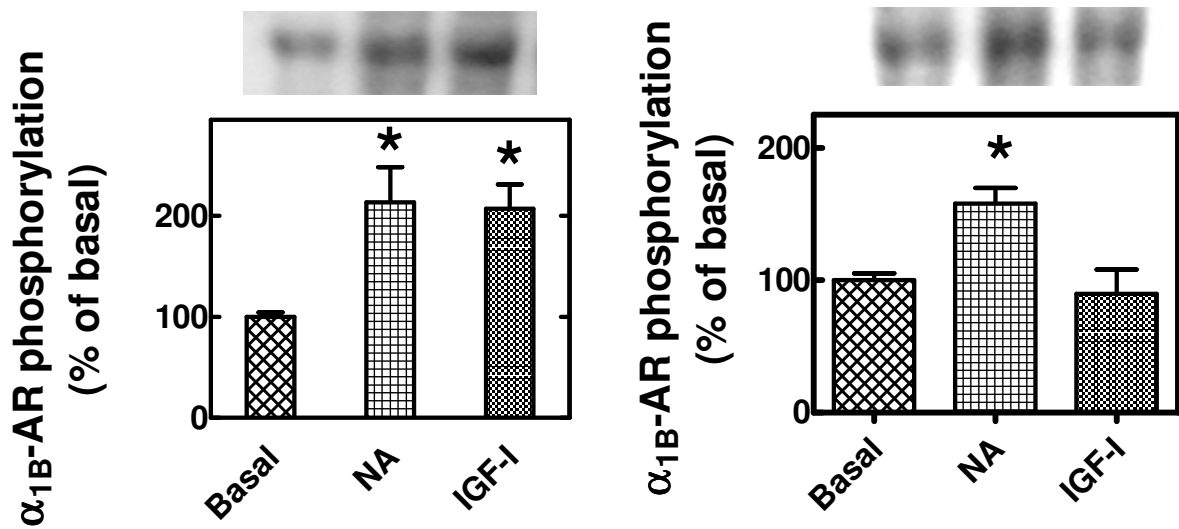


FIGURA 19. EFECTO DE LA COTRANSFECCIÓN DE: LA REGIÓN CARBOXILO TERMINAL DE LA β ARK.SOBRE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENÉRGICO Las células Cos-1 fueron cotransfectadas con el cDNA del receptor α_{1b} -adrenérgico de hamster y con uno de los plásmidos siguientes que expresan: la β -galactosidasa (células control, *panel izquierdo*) y con la región carboxilo terminal de la β ARK (*panel derecho*). La incubación fue por 5 min, en la ausencia (Basal) o en presencia de la noradrenalina 10 μ M (NA) o con el IGF-1 100 ng/ml durante 15 minutos. La gráfica muestra los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar de 5-6 experimentos empleando diferentes preparaciones de las células. Una autoradiografía representativa es mostrada. * $p < 0.001$ vs. Basal.

Para confirmar la participación de la PI3K, se aprovechó la mutante dominante negativa de la subunidad reguladora de la PI3K ($\Delta p85$). La cotransfección del cDNA del receptor α_{1b} -adrenérgico junto con ésta mutante de la PI3K no alteró la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico estimulado por la noradrenalina pero si disminuyó significativamente el efecto del IGF-1, en estas condiciones (Figura 20). La sobreexpresión de subunidad p85 silvestre de la PI3K no alteró el efecto de la noradrenalina ni el del IGF-1 (Figura. 20).

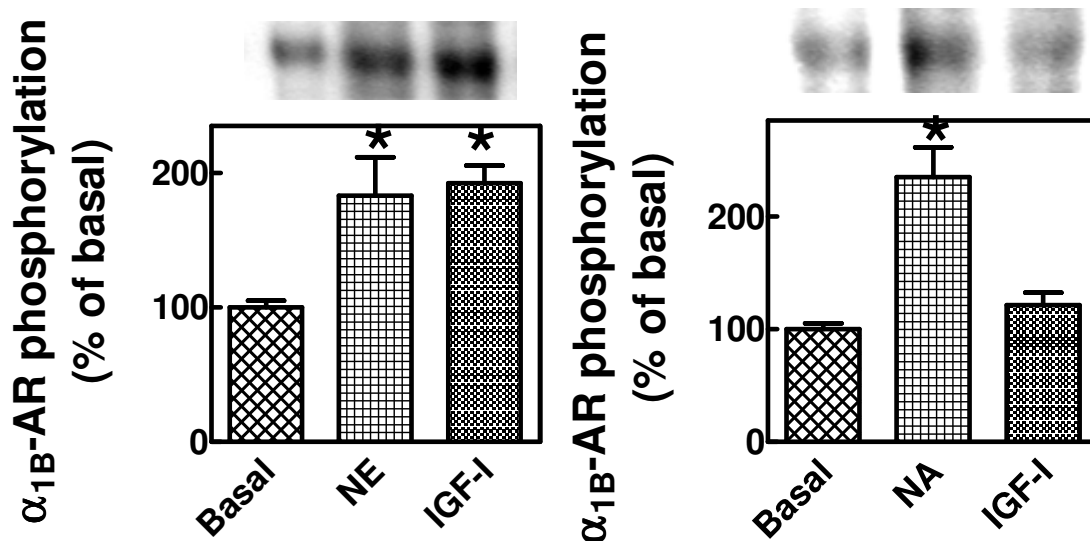


FIGURA 20. EFECTO DE LA COTRANSFECCIÓN DE: LA LA PI3K SILVESTRE, P85; LA DOMINANTE NEGATIVA DE LA PI3K, $\Delta P85$; SOBRE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENÉRGICO. Las células Cos-1 fueron cotransfectadas con el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster y con uno de los plásmidos siguientes que expresan: la PI3K silvestre, p85; (*panel izquierdo*) o la dominante negativa de la PI3K, $\Delta p85$ (*panel derecho*). La incubación fue por 5 min en la ausencia (Basal) o en presencia de la noradrenalina 10 μ M (NA) o con el IGF-1 100 ng/ml durante 15 minutos. La gráfica muestra los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar de 5-6 experimentos empleando diferentes preparaciones de las células. Una autoradiografía representativa es mostrada. * $p < 0.001$ vs. Basal

La expresión de la región carboxilo terminal de la β ARK, de la Δ p85 y de la p85 silvestre fueron comprobados por la técnica de Western blot (Datos no mostrados). Con estos resultados sugerimos que las subunidades $G\beta\gamma$, juegan un papel importante en la transactivación de los receptores de EGF, y comprobamos nuevamente la participación de la PI3K, en el proceso de desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico inducido por el IGF-1.

El IGF-1 promueve la desensibilización y fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, en células DDT1MF2

El efecto del IGF-1, fue estudiado también en la línea celular DDT1MF2. Esta línea celular expresa de forma endógena a los receptores α_{1b} -adrenérgicos y a los receptores del IGF-1. Las células DDT1MF2, nos sirvieron como un modelo fisiológico, reforzando los resultados obtenidos con las células Rat-1.

El efecto en la movilización del calcio intracelular fue determinado en las células DDT1MF2 y nosotros observamos que la noradrenalina indujo un aumento inmediato de la liberación de calcio intracelular, el que después de unos segundos empezó a disminuir casi hacia los niveles basales (Figura. 21). Cuando las células fueron pretratadas 15 minutos con el IGF-1 y estimuladas con la noradrenalina, la acción de la noradrenalina sobre el receptor adrenérgico fue disminuida significativamente, de forma muy similar a lo observado en las células Rat-1 (Figura 21).

En las células DDT1MF2, fue medido el efecto del IGF-1 en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico. El IGF-1 indujo un incremento en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, el cual fue bloqueado por el tratamiento con *la toxina pertussis*. Así como por los inhibidores: AG1478, BB-94 y por el anticuerpo neutralizante del HB-EGF (Figura 22). Con estos resultados reforzamos que el mecanismo propuesto en las células Rat-1 es el mismo que en un modelo fisiológico. Por lo que se pudiera pensar que la fosforilación y desensibilización del

receptor α_{1b} -adrenérgico a través del IGF-1, pudiera tener algunas implicaciones fisiológicas. Sin embargo no sabemos qué tipo de función fisiológica se pudiera llevar a cabo, por lo cual sería muy interesante profundizar en ésto en trabajos futuros.

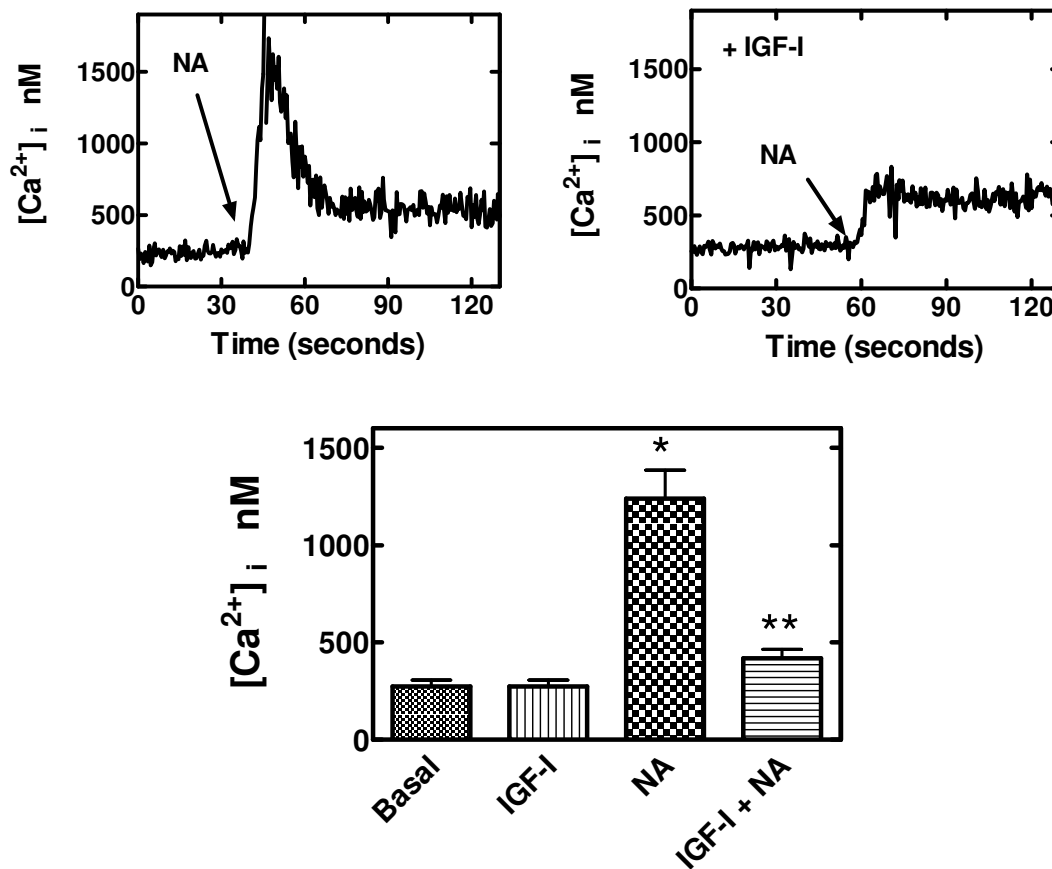


FIGURA 21. EFECTO DEL IGF-1 SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$ INTRACELULAR EN LOS RECEPTORES α_{1b} -ADRENÉRGICOS EN LAS CELULAS DDT1MF2. Las células DDT1MF2 fueron preincubadas en ausencia o en presencia de IGF-1 100 ng/ml por 15min. (Tiempo 0); donde se indica se agregó noradrenalina 10 μ M (NA). El *Panel superior* muestra los trazos representativos de las células. En el panel inferior de muestra a gráfica con los promedios y los errores estándar de 5 experimentos independientes. * $p < 0.001$ vs. el basal , ** $p < 0.001$ vs. la noradrenalina sola

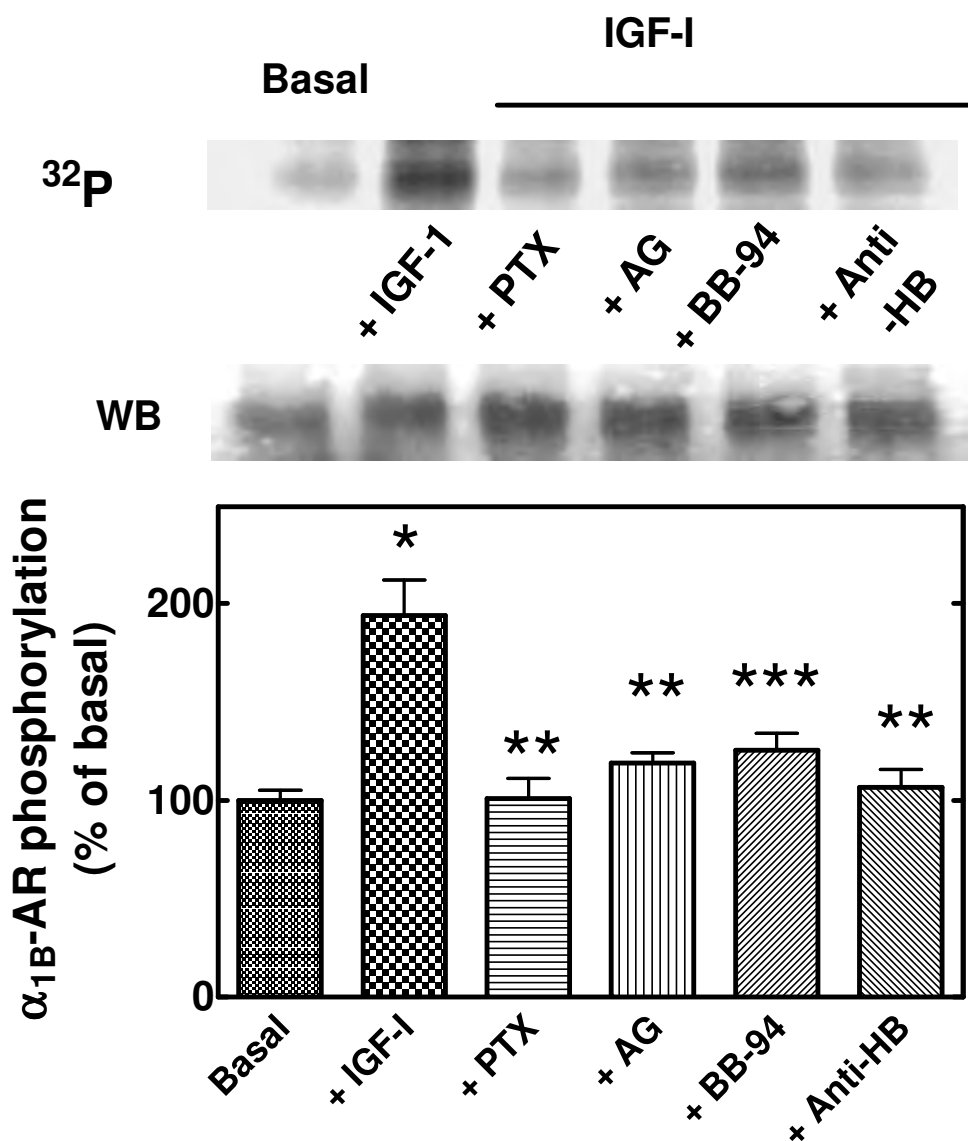


FIGURA 22. EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS, DEL INHIBIDOR DE LAS METALPROTEASAS, DEL INHIBIDOR DEL RECEPTOR DEL EGF Y DEL ANTICUERPO NEUTRALIZANTE DEL HB-EGF, EN LA FOSFORILACION DEL RECEPTO α_{1b} -ADRENERGICO, INDUCIDA POR EL IGF-1. Las células DDT1MF2, que expresan de forma endógena al receptor α_{1b} -adrenérgico, fueron incubadas con la PTX (100ng/ml), 12 horas, con el inhibidor del receptor del EGF AG1478 (5 μ M) 30 minutos, con el inhibidor de las metaloproteasas BB-94 (10 μ M), 30 minutos y con el anticuerpo neutralizante del HB-EGF (5 μ g/ml), 15 minutos. A continuación, las células fueron retadas con el IGF-1 (100ng/ml), 15 minutos. La gráfica muestra los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar de 4-5 experimentos usando diferentes preparaciones de células. * $p < 0.001$ vs el nivel basal; ** $p < 0.05$ vs. La insulina sola; *** $p < 0.01$ vs. el EGF solo; **** $p < 0.05$ vs. el PDGF solo. Una autoradiografía representativa es mostrada de la ^{32}P y de la inmunoprecipitación por Western blot.

SECCION II DE RESULTADOS

Caracterización de la expresión del receptor α_{1b} -adrenérgico humano etiquetado en el carboxilo terminal con la proteína verde fluorescente (GFP) en fibroblastos Rat-1.

El receptor α_{1b} -adrenérgico humano etiquetado en el carboxilo terminal con la proteína verde fluorescente (GFP) fue transfectado establemente en fibroblastos de rata. Esto con el motivo de conocer qué efecto produce el IGF-1 en la internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico. Para contestarnos esa pregunta lo primero que se realizó fueron estudios de unión a ligando para conocer la densidad receptores expresados y su correcta expresión en las células. Se obtuvo que la expresión de los receptores fue de 900-1600 fmol/mg de proteína de membrana, con una alta afinidad a la [³H] prazosina (Kd 0.2-0.3 nM) (Figura. 23). Con estos datos se tiene la seguridad de que el receptor α_{1b} -adrenérgico humano etiquetado con la proteína verde fluorescente se está expresando con una buena cantidad de sitios en las células Rat-1. Además de que muestra una afinidad alta por la prazosina, la cual es un antagonista selectivo de los receptores α_1 -adrenérgicos.

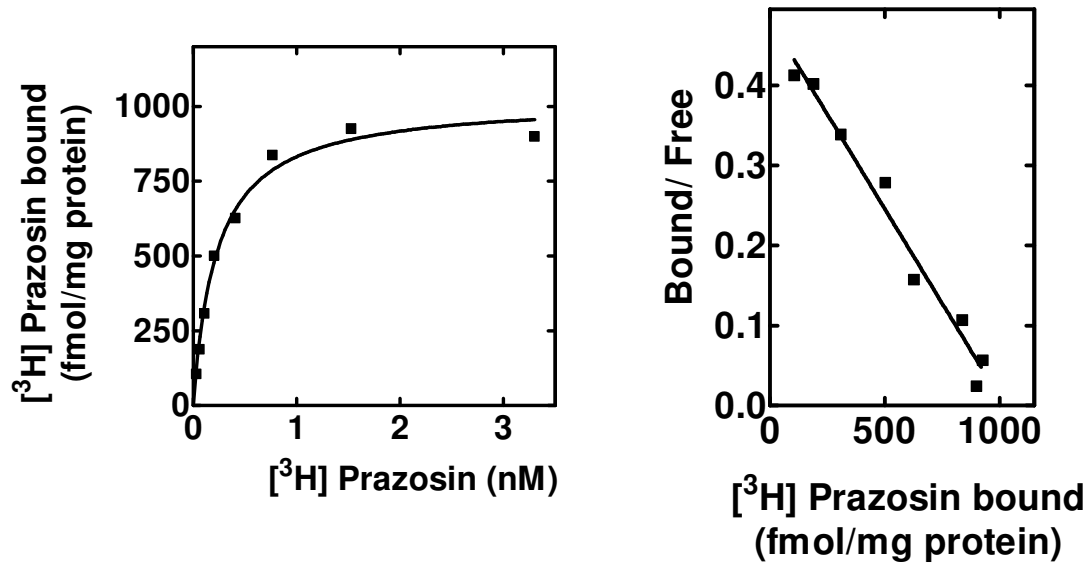


FIGURA 23. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENÉRGICO FUSIONADO A LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE EXPRESADO EN FIBROBLASTOS RAT-1. En el panel izquierdo se muestra una gráfica representativa de la saturación con $[^3\text{H}]$ prazosina. En el panel derecho se muestra la gráfica de transformación Rosenthal de los datos. Se obtuvo una B_{max} de 990 fmol/mg de proteína, K_D 0.18 nM.

En membranas de las células que expresan el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster y en membranas de las células que expresan el receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP, se realizaron experimentos de fotomarcaje con [125 I]-azido-prazosina, para confirmar la expresión del receptor adrenérgico humano. Las membranas se solubilizaron y fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida. En el fotomarcaje, el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster, fue identificado en una banda con un peso molecular aproximado de 80-85 kDa. (Figura.23, carril a). El fotomarcaje del receptor α_{1B} -adrenérgico humano acoplado a la proteína verde fluorescente en la región del carboxilo terminal, mostro una banda con peso aproximado de 115-120 KDa. Siendo este el peso molecular esperado, considerando que el peso molecular de la proteína verde fluorescente es de aproximadamente 27 KDa. (Figura 23, carril b). El pegado específico del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP fotomarcado se realizó con el tratamiento con fentolamina la cual es un antagonista específico de los receptores α_1 -adrenérgicos (Figura 23, carril C). La inmunoprecipitación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP, se realizó con dos anticuerpos, uno de ellos generado contra la GFP (Figura 23, carril d) y el otro anticuerpo generado contra el decapeptido del carboxilo terminal del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster (Figura 23, carril e). El anticuerpo generado contra la GFP precipito el 15-20% del receptor fotomarcado, en cambio el anticuerpo contrala región del carboxilo terminal del receptor de hámster inmunoprecipitó el 1-1% del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP foromarcado. Con estos datos se comprobó que el anticuerpo generado contra la proteína verde fluorescente es un anticuerpo específico que reconoce al receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP y que es útil para realizar experimentos de inmunoprecipitación.

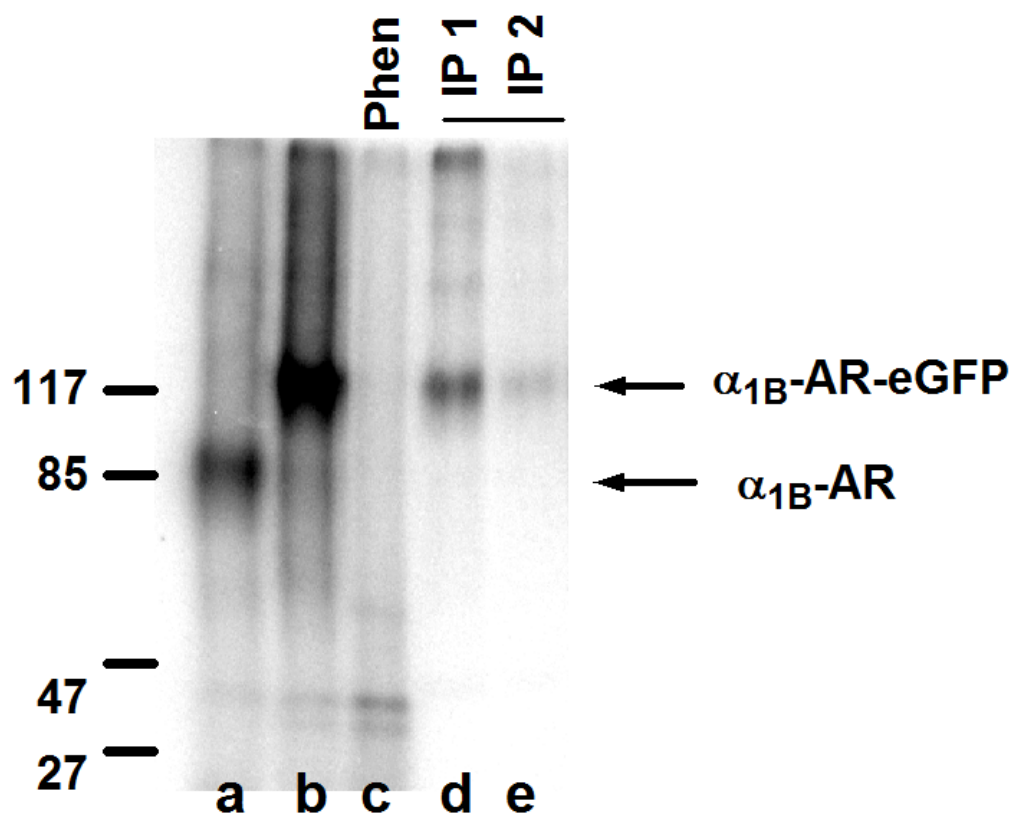


FIGURA 24. FOTOMARCAJE DEL RECEPTOR α_{1b} .ADRENERGICO HUMANO-GFP. Se muestra un gel representativo de las muestras fotomarcadas, el carril a representa al receptor α_{1b} .adrenérgico de hámster, el carril b, representa al receptor α_{1b} .adrenérgico humano-GFP y en el carril c se muestra el tratamiento con la prazosina y el receptor α_{1b} .adrenérgico humano-GFP. Los carriles d y e muestran las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo generado contra la proteína verde fluorescente.

El factor de crecimiento similar a la insulina 1, induce la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP.

El efecto que tiene el factor de crecimiento similar a la insulina 1 en promover la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano, el cual tiene etiquetado a la proteína verde fluorescente en el carboxilo terminal fue estudiado. El IGF-1 indujo un incremento en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP, el cual fue bloqueado por el tratamiento con la *toxina pertussis*. Así como por los inhibidores: AG1478, BB-94 y por la toxina mutante de la difteria (CRM 197), la cual atrapa al ligando HB-EGF. Estos resultados nos confirman que la fosforilación del receptor adrenérgico humano esta mediada por el mismo mecanismo presentado previamente en el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster. Mecanismo en el que participan proteínas G sensibles a la *toxina pertussis*, metaloproteasas, el ligando HB-EGF y el receptor del EGF. (FIGURA 25, panel izquierdo)

Se estudió también la participación de las proteínas cinasas PI3K y PKC, en el mecanismo de fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP, inducido por el IGF-1. Los datos obtenidos demuestran igualmente que los inhibidores de la PI3K, la wortmanina y el LY294002 e inhibidores de la PKC, la estaurosporina y la bisindoleilmaleimida, inhibieron la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP estimulado por el IGF-1. (FIGURA 25, panel derecho)

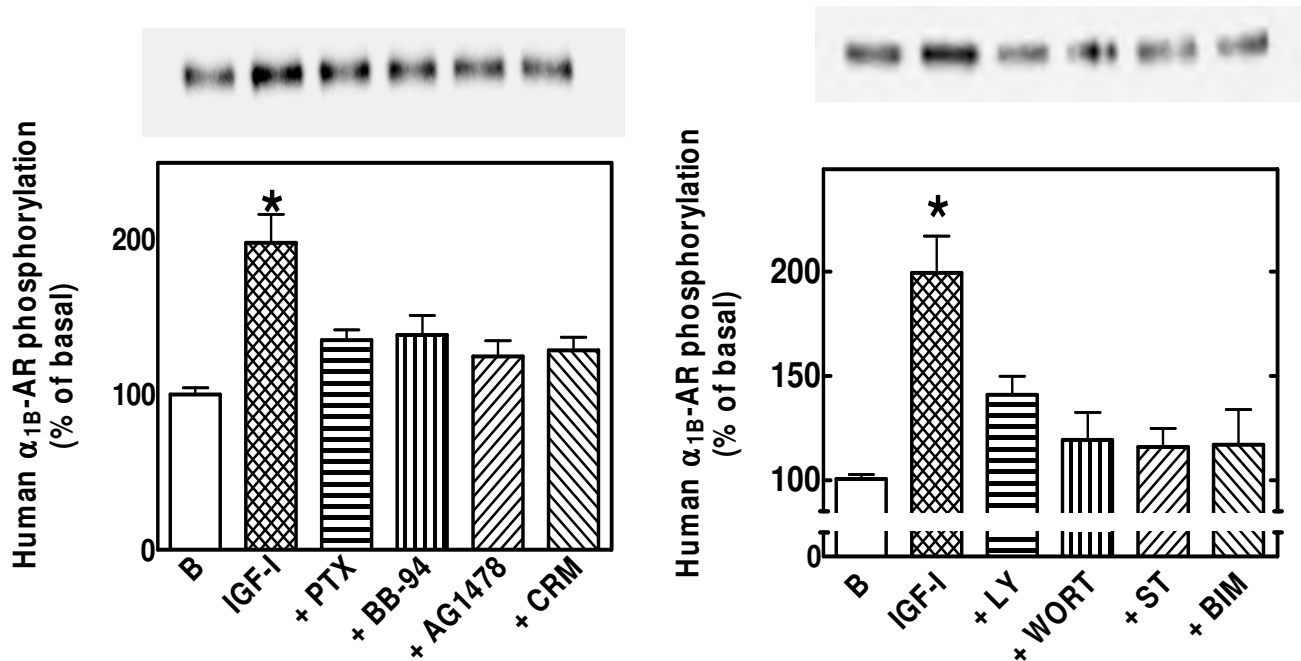
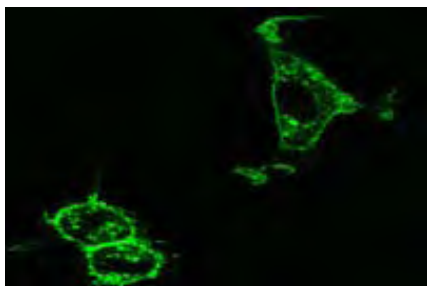


FIGURA 25. EFECTO DEL IGF-1 EN LA FOSFORILACION DEL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO HUMANO-GFP. Panel izquierdo: Las células Rat-1 que expresan al receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP, fueron incubadas con la PTX (100ng/ml), 12 horas, con el inhibidor del receptor del EGF AG1478 (5 μ M) 30 minutos, con el inhibidor de las metaloproteasas BB-94 (10 μ M), 30 minutos y con el anticuerpo neutralizante del HB-EGF (5 μ g/ml), 15 minutos. A continuación, las células fueron retadas con el IGF-1 (100ng/ml), 15 minutos. La gráfica muestra los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar de 4-5 experimentos usando diferentes preparaciones de células. Una autoradiografía representativa es mostrada. * $p < 0.001$ vs el nivel basal; ** $p < 0.05$ vs. La insulina sola; *** $p < 0.01$ vs. el EGF solo; **** $p < 0.05$ vs. el PDGF solo. Panel derecho: Las células Rat-1 que expresan al receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP, fueron incubadas por 30 min en la ausencia o en la presencia de 100 nM de wortmanina (+WT), 1 μ M de LY 294002 (+LY), 1 μ M de estaurosporina (+ST) o 1 μ M de Ro 318220 (+Ro), y fueron estimuladas con 100ng/ml del IGF-1 o el vehículo (Basal), durante 15 minutos. Se muestra una radiografía representativa. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.01$ vs IGF-1 solo.

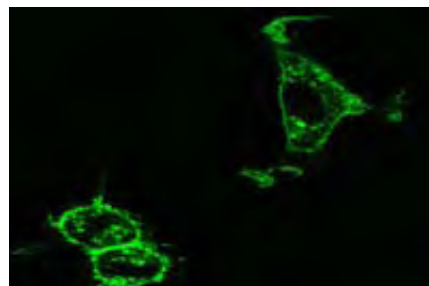
El factor de crecimiento similar a la insulina 1 promueve la internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico.

Estudiamos el efecto que tiene el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), en la localización celular del receptor α_{1b} -adrenérgico acoplado a la proteína verde fluorescente (GFP). Esto se realizó con la ayuda del microscopio confocal. El receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP fue localizado principalmente a nivel de la membrana plasmática y también fue observado en vesículas intracelulares. (FIGURA.26, panel superior) Como tratamiento control, las células fueron mantenidas sin ningún estímulo, durante 15 minutos, para observar el movimiento basal del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP; el cual no presentó ningún cambio en su localización (FIGURA.26, Panel superior). La estimulación de las células con el IGF-1 durante 15 minutos provocó una reducción de la fluorescencia en la membrana plasmática y una acumulación de vesículas alrededor del núcleo (FIGURA 26, Panel inferior). Se utilizó un marcador en rojo específico de la membrana celular, el FM-464, para poder apreciar el empalme con la proteína verde fluorescente, antes y después del tratamiento control y del tratamiento con el IGF-1 (FIGURA. 26, panel inferior).

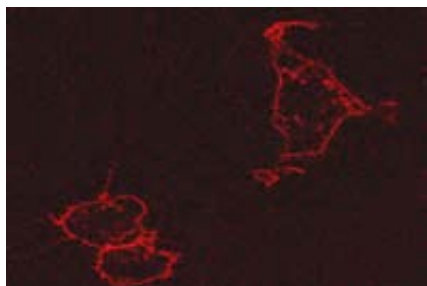
CONTROL



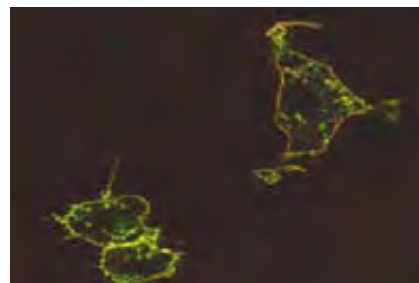
T = 0 MIN



T = 15 MIN

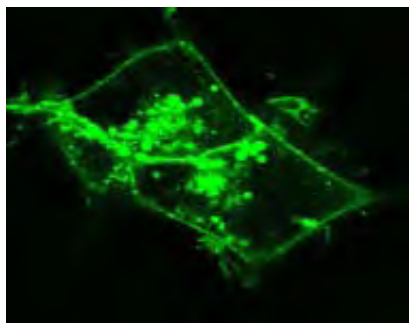


T = 15 MIN FM-464

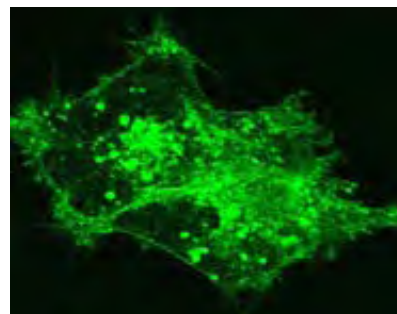


T = 15 MIN MERGE

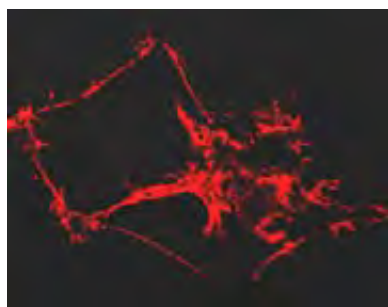
IGF- I



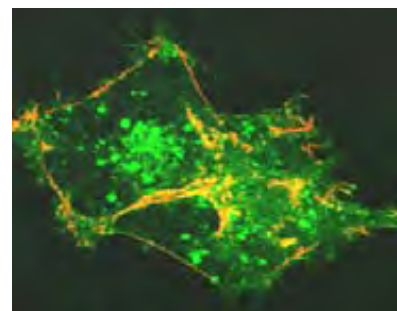
T = 0 MIN



T = 15 MIN



T = 15 MIN FM-464



T = 15 MIN MERGE

FIGURA. 26 IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL QUE MUESTRAN A LAS CÉLULAS RAT-1 QUE EXPRESAN A LOS RECEPTORES α_{1b} -ADRENÉRGICOS ETIQUETADOS CON LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE. Las células fueron incubadas con el vehículo (panel superior). Las células fueron incubadas con 100 ng/ml de IGF-I (panel inferior). Se utilizó un marcador de membrana plasmática, el FM-464 (rojo).

Para comprobar que el receptor α_{1b} -adrérgico humano-GFP es internalizado por la acción del IGF-1, se utilizó sacarosa hipertónica, la cual perturba la internalización mediada por vesículas cubiertas de clatrina de los receptores transmembranales. (Holstein, et, al, 2004) Las células fueron tratadas con sacarosa hipertónica 0.4M durante 30 minutos y después estimuladas con el IGF-1(100 ng/ml) durante 15 minutos. Lo que se observó fue que la localización de los receptores α_{1b} -adrérgico humanos-GFP se mantuvo en la membrana celular. Por lo que se sugiere que la internalización del receptor α_{1b} -adrérgico fue bloqueada. (FIGURA. 27, Panel superior). También se usó concanavalina A, la cual previene la internalización de receptores transmembranales, manteniendo rígida la superficie de la membrana celular debido a la interacción con las lectinas tetravalentes. (Holstein, et,al, 2004). La incubación de las células con la concanavalina A (0.25 μ M), durante 30 minutos de forma similar bloquea la internalización de los receptores α_{1b} -adrérgicos al ser estimulados con el IGF-1 (100 ng/ml) durante 15 minutos. (FIGURA. 27, Panel inferior). Se utilizó un marcador en rojo específico de la membrana celular, el FM-464, para poder apreciar el empalme con la proteína verde fluorescente, antes y después del tratamiento con la sacarosa hipertónica y con la concanavalina A. Con los datos obtenidos demostramos que el IGF-1 promueve la internalización del receptor α_{1b} -adrérgico-GFP promoviendo la formación de vesículas intracelulares.

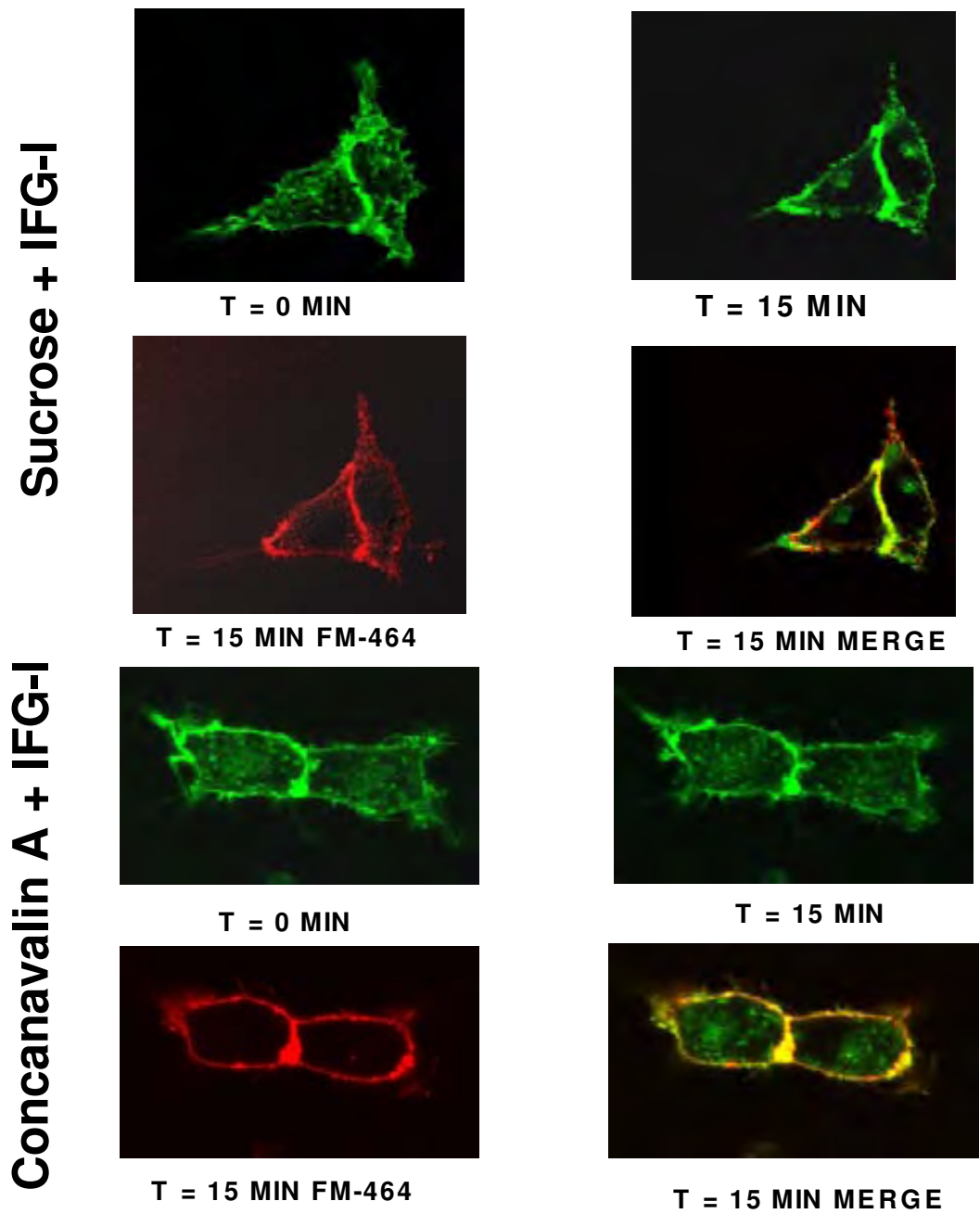


FIGURA. 27 IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL QUE MUESTRAN CÉLULAS RAT-1 QUE EXPRESAN A LOS RECEPTORES α_{1b} -ADRENÉRGICOS ETIQUETADOS CON LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE. Las células fueron preincubadas 30 minutos con sacarosa 0.4 M (Imágenes del panel superior) o con concanavalina A (0.25 μ g/ml) por 30 minutos y estimuladas con 100 ng/ml IGF-I por los tiempos indicados. Se utilizó un marcador de membrana plasmática, el FM-464 (rojo).

XI. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en esta tesis demuestran que la activación de los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), inducen la fosforilación, desensibilización e internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico.

Mediante ensayos de marcaje metabólico con ^{32}P , se observó que el IGF-1 es capaz de inducir la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico hasta 400% veces más que el basal y muestra un comportamiento dosis-dependiente, con una EC_{50} de 13 ng/ml. También se observó el comportamiento curso-temporal de la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1. El curso-temporal de la fosforilación muestra que el tiempo de estimulación con el IGF-1 es un factor importante, ya que es observada desde los 5 minutos de estímulo con el IGF-1 y alcanza el efecto máximo de fosforilación entre los 10 y 15 minutos. De forma interesante se observó que entre los 30-60 minutos de estímulo con el IGF-1 la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico disminuye casi al valor basal. Así mismo, el comportamiento curso-temporal de la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducido por la noradrenalina, muestra un comportamiento similar, el cual disminuye casi al valor basal a los 60 minutos de estimulación (Vázquez, et al., 1997). Por el contrario, la cinética curso temporal de la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el ácido okadaico, el cual es un inhibidor de las fosfatasa 1, 2A y 2B, muestra un incremento en el estado de fosforilación, el cual se sostiene hasta los 60 minutos (Alcántara, et al., 2000). Por lo tanto, las fosfatasa participan en la desensibilización homóloga y heteróloga, regulando la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico.

La desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico fue muy clara en los fibroblastos Rat-1. Cuando las células se preincubaban con el IGF-1 durante 15 minutos y después son estimuladas con la noradrenalina, el efecto en la producción de los fosfatos de $[\text{}^3\text{H}]$ inositol y de la liberación del calcio intracelular se reducen significativamente. Esta reducción en la producción de fosfatos de inositol y de la liberación de calcio intracelular, hace pensar en un mecanismo de desensibilización mediada por el IGF-1, probablemente debido a mecanismos que modifican la capacidad del receptor α_{1b} -adrenérgico para responder a la noradrenalina.

Es importante mencionar que este fenómeno de desensibilización asociado a la disminución funcional del receptor α_{1b} -adrenérgico a través de la activación de los receptores del IGF-1, es compartido también por el receptor α_{1D} -adrenérgico (Rodríguez-Pérez, et al., 2009). El efecto del TGF- β sobre la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico, fue observada al ver disminuida la producción de fosfatos de inositol al incubar a las células 15 minutos con el TGF- β y después estimular con la noradrenalina. Efecto que no fue observado en los experimentos realizados de la cuantificación de calcio intracelular (Rómero-Ávila, et al., 2002). En contraste, la insulina induce una desensibilización funcional pequeña la cual fue difícil de determinar en los receptores α_{1b} -adrenérgicos expresados en los fibroblastos Rat-1, aunque la desensibilización funcional fue más clara y evidente en las células de DDT1-FM2 que expresan endógenamente a los receptores α_{1b} -adrenérgicos (García-Sáinz, et al., 2004). Estas diferencias entre los procesos de desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico mediado por distintas hormonas, muestran que el contexto celular juega un papel importante en las consecuencias funcionales de las acciones de estas hormonas. Muchos factores pueden contribuir a estas diferencias, entre ellos, la densidad relativa de los receptores expresados. Así como, la especificidad por sus sustratos y su disponibilidad.

En general se asume que son los receptores de siete dominios transmembranales los que se acoplan a las proteínas G. Sin embargo, se conoce que los receptores con un sólo dominio transmembranal, incluyendo a aquellos con la actividad de cinasa de tirosina, también pueden interactuar directa o indirectamente con las proteínas G, que a su vez pueden mediar algunas de sus acciones (Patel, 2004). En este trabajo, se demostró que la *toxina pertussis* inhibe la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por los receptores del IGF-1. Lo que sugiere que en la regulación funcional del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1, puedan estar participando proteínas G de la familia Gi. Además, se demostró que la acción de la insulina, del EGF y del PDGF en inducir la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico, también es sensible a la *toxina pertussis*.

Es importante enfatizar que la *toxina pertussis* no bloquea completamente los efectos de éstos factores de crecimiento, lo que indica que estas proteínas G no son los únicos mediadores de los efectos y es probable que la actividad de proteína cinasa de tirosina de estos receptores y la formación de residuos de fosfotirosina en sus proteínas blanco, llevan a cabo también un papel importante de la regulación de estos receptores.

El grupo de Nishimoto (Nishimoto, et al., 1987), reportó que el IGF-1 se acopla a proteínas G heterotriméricas. Actualmente se conoce que el IGF-1 se asocia con las subunidades G α i y al dímero G $\beta\gamma$ (Dalle, et al., 2001). Sin embargo aún no se conoce con exactitud si la interacción del receptor con las proteínas G α i es directa. Existe la posibilidad de la participación de otro receptor acoplado a proteínas G sensibles a la *toxina pertussis*. Como el receptor de la esfingosina 1 fosfato (S1PR), y la cinasa de la esfingosina (Sphk1), la cual cataliza la fosforilación de la esfingosina en esfingosina 1 fosfato (S1P) (revisado en García-Sáinz, et al 2008). La S1P es transportada a través de la membrana celular por la proteína transportadora Spns2 (Kawara, A, et al, 2009), para activar a sus receptores. Existe evidencia en la literatura que la activación de la cinasa Sphk1, a través de receptores con actividad de cinasa de tirosina, promueve la transactivación de los receptores de EGF, y esta transactivación se ha visto relacionada con la fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G. (revisado en, García-Sáinz, et al 2008). En nuestro laboratorio hemos realizado experimentos para profundizar en esta interesante asa de regulación paracrina-autocina de la vía de señalización la S1P, el cual hace aún más complejo el estudio de la desensibilización heteróloga.

En el laboratorio del Dr. García Sáinz, se reportó que la activación de las proteínas G sensibles a la *toxina pertussis* por el receptor del ácido lisofosfátidico (LPA), induce la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico vía HB-EGF por las metaloproteasas, que lleva a la activación autocrina de los receptores de EGF. (Casas, et al, 2003). Tomando en cuenta los resultados que mostraron la participación de proteínas G sensibles a la *toxina pertussis* en la fosforilación del

receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1. Existe la posibilidad de que un proceso similar al reportado con el LPA pueda ocurrir en la regulación de la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por la activación de los receptores del IGF-1.

Para investigar si ese fenómeno puede ocurrir, las células Rat-1 fueron preincubadas 30 minutos con el inhibidor de las metaloproteasas, el BB-94 y después estimuladas con el IGF-1. Fue observado que el efecto producido por el inhibidor disminuyó significativamente la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1. De forma similar sucedió con el inhibidor de la actividad de cinasa de tirosina del receptor de EGF, el AG1478 y con el anticuerpo neutralizante del ligando HB-EGF. Ambos inhibidores disminuyeron el efecto de fosforilación producida por la noradrenalina (Casas-González, et al., 2006). Los autores reportaron que el anticuerpo neutralizante del ligando HB-EGF, disminuye también la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por la noradrenalina. En la figura 29 se muestra un esquema representativo de esta asa de regulación autocrina/paracrina entre el receptor α_{1b} -adrenérgico y la transactivación del receptor de EGF. (Casas-González, et al., 2006).

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1 involucra la transactivación de los receptores de EGF por una vía autocrina, en la que interviene la activación de las metaloproteasas y del ligando HB-EGF. Existe evidencia que indica que los receptores del IGF-1 y los receptores del EGF interaccionan, a través de vías autocrinas, las cuales podrían ser importantes para algunas de sus acciones (Adams, et al, 2004; Roudabush, et al, 2000). El IGF-1 induce la activación de proteínas cinasas MAPK las cuales pueden ser bloqueadas por los inhibidores del receptor para EGF con la actividad intrínseca de proteína cinasa de tirosina, en las células Cos-7 (Roudabush, et al, 2000). También se ha demostrado que este efecto se abate por la toxina de Glu52 diftérica (un inhibidor de la generación del HB-EGF) y por la 110-fenaltfrolina (un quelante de metales y además de un inhibidor general de las metaloproteasas) (Roudabush, et al, 2000). Ullrich y colaboradores (Daub, et

al, 1996; Daub, et al., 1997; Shafer, et al, 2004) hicieron la observación de que la activación de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a las proteínas G inducen la transactivación de los receptores del EGF, a través del rompimiento del ligando HB-EGF por las metaloproteasas, y que este mecanismo participa en algunas de sus acciones. Nuestros resultados aquí presentes y los de Roudabush y colaboradores (Roudabush, et al, 2000) indican que tal concepto puede ser extendido a los receptores con actividad de proteína cinasas de tirosina y a otros receptores que se acoplen a las proteínas de G. Es muy probable que este proceso pueda tener importancia fisiológica en la proliferación y en la diferenciación celular y patológica en algunos tipos de cáncer particularmente en el caso de IGF-1 el cual se conoce que es un potente inhibidor del proceso de apoptosis (Adams, et al, 2004

Nuestros datos indican también la participación de dos proteínas cinasas, la PI3K y la PKC en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1. La fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1, fue inhibida por la acción de los inhibidores selectivos de la PKC, la estaurosporina y el BIM. La PKC representa una familia de proteínas con actividad de cinasa sobre residuos de serina y treonina. Estas enzimas participan en las vías de transducción activadas por la acción hormonal y por los factores de crecimiento. Las PKCs se clasifican en tres grupos 1) PKC convencionales (α , βI , βII y γ), que son dependientes de Ca^{2+} y activadas por el DAG. 2) Las PKCs nuevas (δ , ϵ , ϕ y η), se regulan por la producción de la fosfatidilserina y el DAG. Y 3) las PKCs atípicas (ι , λ y ζ), son independientes de calcio y no requieren el DAG para su activación (Newton, 1995).

Existe evidencia de que la PKC participa en la regulación de los receptores α_{1b} -adrenérgicos. El estudio pionero de esta regulación se observó en hepatocitos de rata que expresan estos receptores. Se observó que al tratar a los hepatocitos con TPA, la respuesta adrenérgica fue bloqueada (Corvera et al., 1984). La PKC participa también en la regulación por fosforilación de otros subtipos de receptores adrenérgicos, como son: el receptor α_{1A} (Vázquez-Prado, et al., 2000), el receptor

α_{1D} -adrenérgico (García-Sáinz, et al., 2001). Así como en los receptores AT1 y AT2 de angiotensina II (Olivares-Reyes et al., 2000; García-Caballero, et al., 2001).

Se ha reportado que en las células Rat-1 tres isoformas diferentes de la PKC α , δ y ϵ coimmunoprecipitan con el receptor α_{1b} -adrenérgico, en condiciones basales o al ser estimuladas con noradrenalina, endotelina o con TPA (Alcántara-Hernández, et al., 1998). En este trabajo no se determinaron las isoformas de la PKC que se asocian al receptor α_{1b} -adrenérgico al ser estimulados con el IGF-1, por lo que sería muy interesante profundizar en este tipo de asociación para distinguir la isoforma ó isoformas que intervienen en la desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico.

De manera similar los inhibidores de la PI3K, la wortmanina y el LY, inhibieron el efecto de fosforilación inducida por el IGF-1. La participación de la PI3K en este mecanismo de desensibilización heteróloga fue confirmada en las células Cos-1, con el uso de una dominante negativa de la subunidad adaptadora p85 ($\Delta p85$) (Hara, et al, 1994). Esta dominante negativa carece del sitio de unión para la subunidad catalítica (p110), por lo que carece de actividad enzimática. Los datos revelaron que en las células co-transfectadas con el cDNA del receptor α_{1b} -adrenérgico y la $\Delta p85$, la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida con el IGF-1 fue disminuida.

La PI3K comprenden tres clases de isoformas (I-III), que intervienen en funciones celulares muy diversas como la progresión del ciclo celular, en el crecimiento celular, la adherencia celular, la supervivencia y en el tráfico de proteínas intracelulares, entre muchas otras funciones (Cantley LC 2002; Wymann, et al 1998). La PI3K al ser activada, genera dos fosfoinosítidos, el $PI_{[3,4]}P_2$ y el $PI_{[3,4,5]}P_3$. Se ha demostrado que estos fosfoinosítidos son capaces de promover la activación de las de la PKCs atípicas y nuevas. Estos lípidos modulan a la proteína cinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PKD-1), que activa y fosforila a algunas isoformas de la PKC (Alessi, et al, 1998; Stephens, et al, 1997). Por consiguiente, es probable que la PI3K pueda activar a la PKC a través de la PDK-1, generando los fosfatidilinosítoles-3, ó por ambos procesos.

La transfección del plásmido codificante para el extremo carboxilo (Gly⁴⁹⁵-Leu⁶⁸⁹) de la cinasa del receptor β -adrenérgico ó β ARK, en las células Cos-1, revelaron que las subunidades $G\beta\gamma$ participan en la desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1. La fosforilación inducida por el IGF-1 disminuyó significativamente en las células transfectadas con la β ARK. La β ARK es una herramienta poderosa para conocer la participación del dímero $G\beta\gamma$, ya que en los residuos de aminoácidos Gln⁵⁴⁶-Ser⁶⁷⁰ presenta un dominio de unión para $\beta\gamma$.(Koch, et al., 1994). La subclase I_B de la PI3K son activadas por el dímero $\beta\gamma$, pero no hay que descartar que las subunidades $\beta\gamma$, actúen como activadoras de las metaloproteasas, para inducir la transactivación del receptor de EGF (revisado en García-Sáinz, et, al, 2008).

La fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G se han asociado a su internalización mediada por el agonista (desensibilización homóloga). La fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G incrementa la afinidad de estos por proteínas citoplasmáticas, conocidas como arrestinas. (Lutrell y Lefkowitz, 2002). El reclutamiento de las arrestinas desensibiliza la señal por un bloque estérico por la interacción del receptor con las proteínas. G. las arrestinas actúan como proteínas adaptadoras, facilitando la endocitosis de los receptores acoplados a proteínas G, a través de vesículas recubiertas de clatrina. (Penn et, al., 2000; Pitcher et al., 1998; Pitcher et al., 1995). Los receptores internalizados pueden ser desfosforilados y reciclados a la membrana celular ó degradados en vesículas del lisosoma.

Para conocer el efecto del IGF-1 en la internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico, se clono al receptor α_{1b} -adrenérgico humano en un vector que expresa a la proteína verde fluorescente. La construcción fue transfectada en fibroblastos Rat-1 y después la clona seleccionada fue caracterizada mediante estudios de unión al ligando y experimentos de fotomarcaje. El ensayo de unión al ligando permitió clasificar al receptor de acuerdo a su perfil farmacológico, además de conocer el numero de receptores expresados en las membranas de las células. La cantidad de receptores α_{1b} -adrenérgicos humanos expresados en las membranas

fue de 900-1600 fmol/mg de proteína. Estos datos indican una alta densidad de receptores expresados en las membranas. En las células Rat-1 que expresan al receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster la cantidad de receptores expresados es alrededor de 1200 fmol/ mg de proteína. Por lo tanto ambos subtipos de receptores α_{1b} -adrenérgicos son expresados abundantemente en las membranas celulares, lo que facilita la comparación de los resultados obtenidos.

El fotomarcaje del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP con la [¹²⁵I-aryl]-azido-prazosina, confirmó la presencia del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP, con un peso molecular de 115-120 kDa, que corresponde correctamente, ya que el receptor nativo pesa alrededor de 80 KDa y la proteína verde fluorescente tiene un tamaño aproximado de 27 KDa. El anticuerpo generado contra la proteína verde fluorescente, inmunoprecipitó alrededor del 15-20% del receptor fotomarcado. En comparación con el anticuerpo generado contra el carboxilo terminal del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster, el cual inmunoprecipitó solo el 1-2 % del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP. Esto pudiera deberse a que la GFP que se encuentra en el carboxilo terminal del receptor provoque un impedimento estérico que dificulte el reconocimiento del anticuerpo del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster.

El IGF-1 indujo una fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano-GFP de aproximadamente de 2 veces más que el basal. Este efecto de fosforilación fue disminuido por los inhibidores de metaloproteasas (BB-94), por el inhibidor de la actividad de tirosina cinasa del receptor de EGF (AG1478) y por la mutante de la toxina diftérica (CRM197), que inhibe la unión del HB-EGF. Así como también por el uso de la *toxina pertussis*. El efecto de fosforilación también fue bloqueado por los inhibidores selectivos de la PI3K, LY y wortmanina. Y por los inhibidores de la PKC, estaurosporina y BIM. Estos datos vuelven a confirmar el mecanismo propuesto de desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico inducido por el IGF-1. El receptores α_{1b} -adrenérgico de hámster y el humano, presentan algunas diferencias dentro de sus secuencias de aminoácidos (SWISS-PROT: P35368 y P1841). Los sitios de fosforilación por PKC y GRKs, se encuentran en el

carboxilo terminal de ambos receptores. El receptor α_{1b} -adrenérgico humano no presenta un sitio potencial de fosforilación por PKC y tiene cuatro aminoácidos más en su extremo carboxilo terminal, que el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster. A pesar de estas diferencias, los datos obtenidos de fosforilación y desensibilización inducidos por el IGF.1, son muy similares en ambos subtipos de receptores α_{1b} -adrenérgicos.

Nuestros datos de microscopia confocal indican que la desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico está estrechamente relacionada con la fosforilación e internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por el IGF-1. El tratamiento de las células con inhibidores de la internalización, como son la sacarosa hipertónica y la concanavalina A; nos hacen pensar en un proceso de internalización mediado a través de la fosforilación independiente del agonista, llevando a la formación de vesículas endocíticas en la membrana celular. Previa observaciones indican que la proteína cinasa C juega un papel importante en la internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico (Cowlen and Towes, 1998; Fonseca et al. 1995). Estudios realizados en el laboratorio, con el receptor del ácido lisofosfatídico (LPA), mostraron también que la activación de la PKC puede jugar un papel importante en la internalización del receptor para LPA (Avendaño, et al, 2005). El grupo de Malbon, (Gavi, et, al., 2007), demostró que el receptor de insulina, a través de la PKB/AKT, provoca la fosforilación del receptor β -adrenérgico, en la Tyr350 y en la Tyr364. Y que la fosforilación de la Tyr 350, promueve la activación de sitios SH2, que funciona como anclaje para reclutar proteínas, como la dinamina, la cual participa en el mecanismo de internalización del receptor β -adrenérgico (Gavi, et al, 2006). La participación de las proteínas, como las GRKs, las β -arrestinas y la dinamina, que regulan la internalización de los receptores ocupados por el agonista (desensibilización homóloga), no debe de ser descartada su participación en la internalización mediada por la desensibilización heteróloga.

XII. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos muestran claramente que el IGF-1 activa una vía de señalización compleja que lleva a la fosforilación, a la desensibilización y a la internalización del receptor α_{1b} -adrenérgico en un proceso que involucra a las proteínas de G sensibles a la *toxina pertussis*, a la transactivación de los receptores del EGF y a la activación de la PI3K y la PKC. Por lo que podemos sugerir el siguiente modelo :(FIGURA 28)

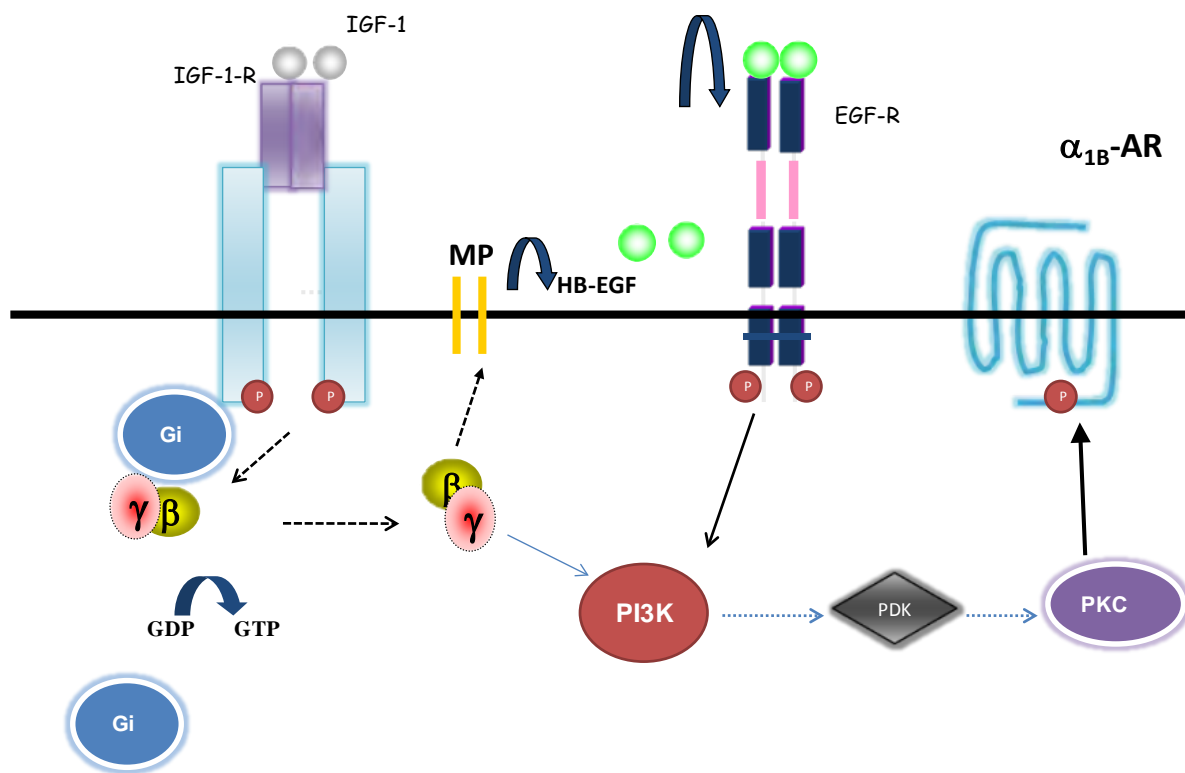


FIGURA 28. MODELO REPRESENTATIVO DE LA REGULACIÓN CRUZADA ENTRE EL RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO Y EL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA 1. Al ser estimulado el receptor para el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-R), proteínas Gi son activadas. El dímero $\beta\gamma$ de las proteínas Gi, cataliza la activación de las metaloproteinasas (MP), las cuales hidrolizan de la membrana celular el ligando HB-EGF. El HB-EGF, activa a los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R). Esto promueve la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). La PI3K es capaz de activar a la proteína quinasa C (PKC) y esta PKC fosforila, desensibiliza e internaliza a los receptores α_{1b} -adrenérgicos.

ANEXO

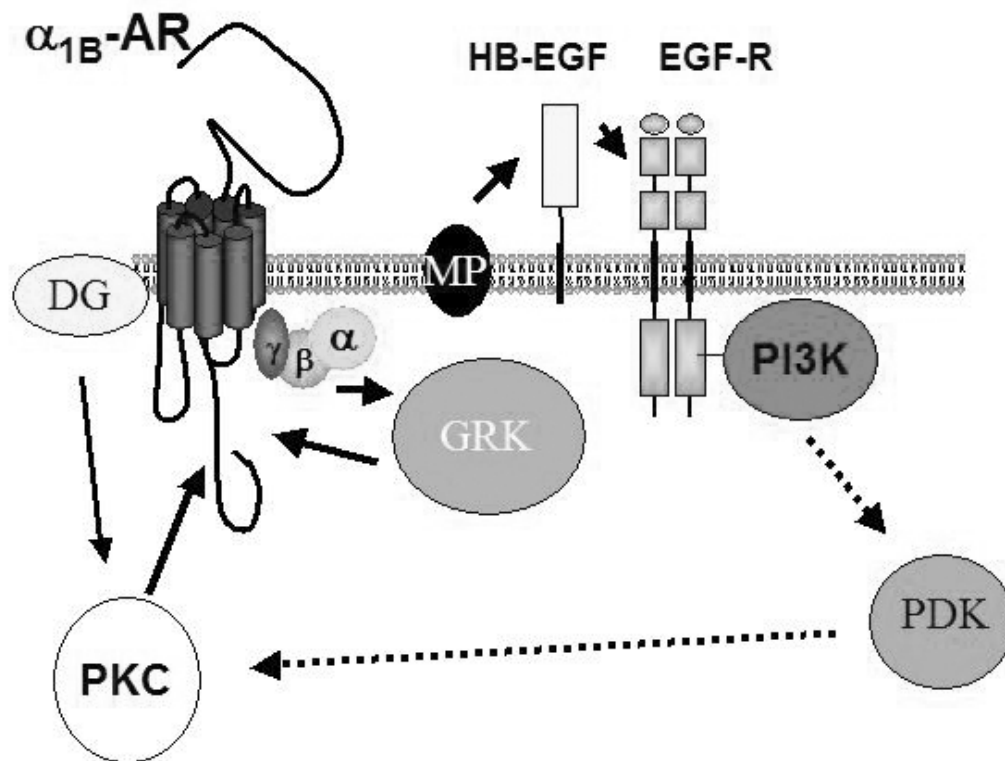


FIGURA 29. MODELO QUE REPRESENTA LA DESENSIBILIZACIÓN HOMÓLOGA DEL RECEPTOR α_{1B} -ADRENÉRGICO A TRAVÉS DE LA TRANSACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE EGF. El receptor α_{1B} -adrenérgico es regulado de forma homóloga a través de la transactivación del receptor de EGF. DG: diacil glicerol, PKC: Proteína C inactiva, GRK: cinasa dependiente de receptores acoplados a proteínas G, MP: metaloproteasa, HB-EGF: ligando del receptor de EGF que une a heparina, EGF-R: receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa, PDK: cinasa dependiente de fosfoinosítidos.

Phosphorylation, desensitization and internalization of human α_{1B} -adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I

Tzindilú Molina-Muñoz, M. Teresa Romero-Ávila, S. Eréndira Avendaño-Vázquez, J. Adolfo García-Sáinz*

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

Received 16 April 2007; received in revised form 21 August 2007; accepted 24 August 2007

Available online 19 September 2007

Abstract

The effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on human α_{1B} -adrenoceptor function, phosphorylation state and cellular location was studied. Rat-1 fibroblasts were transfected with a plasmid construction containing enhanced green fluorescent protein joined to the carboxyl terminus of the human α_{1B} -adrenoceptor. Receptors were identified by radioligand binding and photoaffinity labeling, and were immunoprecipitated with an antiserum generated against the enhanced green fluorescent protein. The receptor was functional, as evidenced by noradrenaline action on intracellular calcium and inositol phosphate production. IGF-I had no significant effect by itself on these parameters but markedly reduced the effects of noradrenaline. IGF-I induced α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation, which was markedly reduced by the following agents: pertussis toxin, a metalloproteinase inhibitor, diphtheria toxin mutant CRM 197, an epidermal growth factor (EGF) receptor intrinsic kinase activity inhibitor, and by phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C inhibitors. IGF-I action appears to involve activation of a pertussis toxin-sensitive G protein, shedding of heparin-binding EGF and autocrine activation of EGF receptors. G protein subunits and phosphotyrosine residues stimulate phosphoinositide 3-kinase activity leading to activation of protein kinase C, which in turn phosphorylates α_{1B} -adrenoceptors. Confocal fluorescent microscopy showed that α_{1B} -adrenoceptors fused to the green fluorescent protein were located in plasma membrane and intracellular vesicles in the basal state. IGF-I induced receptor redistribution favoring the intracellular location; this effect was blocked by hypertonic sucrose and concanavalin A. Our data show that IGF-I induces α_{1B} -adrenoceptor desensitization associated to receptor phosphorylation and internalization. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: α_{1B} -adrenoceptor; IGF-I; Receptor phosphorylation; Receptor internalization; Desensitization

1. Introduction

Cellular responses to a wide variety of stimuli such as light, odors, tastes, hormones, autacoids or neurotransmitters are mediated through G protein-coupled receptors. Cells modulate their ability to respond to these stimuli by desensitizing/resensitizing such receptors. These processes involve many cellular and molecular events with different time frames. However, at the molecular level, receptor phosphorylation is one of the earliest events that control receptor function (García-Sáinz et al., 2000; Pitcher et al., 1998).

Two major types of desensitization exist: homologous and heterologous desensitizations. Homologous desensitization, in

which agonist-occupied receptors reduce their responsiveness, mainly involves receptor phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases (Penn et al., 2000). In heterologous desensitization, the responsiveness of a given receptor decreases when another pharmacologically unrelated receptor or another signaling device (such as protein kinases) are activated; this desensitization principally involves phosphorylation of receptors and other signaling entities by second messenger-activated kinases, such as protein kinases A and C (Claing et al., 2002; Vázquez-Prado et al., 2003). It has been observed that phosphorylation of G protein-coupled receptors is associated with receptor internalization.

Our group has characterized the molecular processes and pathways involved in heterologous α_1 -adrenoceptor desensitization. Thus, we have shown that activation of seven transmembrane domain receptors coupled to $G_{\beta\gamma}$ (such as endothelin ET_A

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5603; fax: +52 55 3616 0099.
E-mail address: agarcia@ifc.unam.mx (J.A. García-Sáinz).

(Vázquez-Prado et al., 1997) or bradykinin B₂ receptors (Medina et al., 1998), or coupled to G_i (such as lysophosphatidic acid receptors (Casas-González and García-Sáinz, 2006; Casas-González et al., 2003; Casas-González et al., 2000)), intracellular receptor (estrogen receptor α (González-Arenas et al., 2006)) or receptors with intrinsic tyrosine kinase activity (such as those for insulin (García-Sáinz et al., 2004)), EGF (epidermal growth factor) (Medina et al., 2000) or platelet-derived growth factor (Medina et al., 2000) can induce α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation/desensitization. Protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and EGF receptor transactivation are key participants in these effects (Casas-González and García-Sáinz, 2006; Casas-González et al., 2003; García-Sáinz et al., 2000; Medina et al., 2000; Molina-Muñoz et al., 2006; Vázquez-Prado et al., 2003).

Recently, we showed that insulin-like growth factor-I (IGF-I) induces adrenoceptor phosphorylation associated to desensitization of hamster α_{1B} -adrenoceptors (Molina-Muñoz et al., 2006). Such α_{1B} -adrenoceptor desensitization/phosphorylation takes place through a complex pathway that involves pertussis toxin-sensitive G proteins, EGF receptor transactivation, and phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C activities (Molina-Muñoz et al., 2006).

In the present work, we further explore IGF-I effect by studying the following two aspects: a) whether this growth factor also affects the human α_{1B} -adrenoceptor, and b) whether its effect induces α_{1B} -adrenoceptor internalization. We have previously shown that human α_{1B} -adrenoceptors are subject to homologous and heterologous desensitization by adrenergic amines and phorbol esters, respectively, and that such effects are associated with receptor phosphorylation (García-Sáinz et al., 1999). We tagged the carboxyl terminus of the human α_{1B} -adrenoceptor with enhanced green fluorescent protein (eGFP) by molecular biological techniques and stably expressed the fused receptor in rat-1 fibroblasts. Our results indicate that IGF-I is able to induce α_{1B} -adrenoceptor desensitization and phosphorylation in these cells by means of a process similar to that observed with the hamster receptor and that such action is associated with adrenoceptor internalization.

2. Materials and methods

2.1. Materials

(-)-Noradrenaline, IGF-I, staurosporine, wortmannin, bis-indolyl-maleimide I, the diphtheria toxin mutant CRM 197, protease inhibitors, concanavalin A and chloroquine were obtained from Sigma Chemical Co. LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) and tyrphostin AG1478 (4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline) were obtained from Calbiochem. Pertussis toxin was purified at our laboratory as described (García-Sáinz et al., 1992). Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from Life Technologies. [³²P]PI (8500–9120 Ci/mmol), [2,3-³H]myo-inositol (22.9 Ci/mmol), [³H]prazosin (74.4 Ci/mmol) and [¹²⁵I]-ary[1]-azido-prazosin (2200 Ci/mmol) were obtained from Perkin Elmer Life Sciences and sepharose-coupled protein A from Upstate

Biotechnology. Dr. Mobashery (Wayne State University, Detroit, MI, USA) generously provided us with a sample of BB-94 (Batimastat) (N4-hydroxy-N1-(2-(methylamino)-2-oxo-1-(phenylmethyl) ethyl)-2-(2-methylpropyl)-3-((2-thienylthio) methyl)-, (2R-(1(S*),2R*,3S*)))-butanediamide). DNA purification kits were obtained from Qiagen and chemiluminescence kits from Pierce. The pDrive cloning system was purchased from QIAGEN and the pEGFP-N1 vector from Clontech. FM-464 was obtained from Molecular Probes.

2.2. Plasmid construction

Dr. Gozoh Tsujimoto (Department of Genomic Drug Discovery Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan) generously provided us with the 1.8 kb-full length-coding region of the human α_{1B} -adrenoceptor cloned into pME-18S plasmid. The receptor gene sequence was amplified and its stop codon was removed by polymerase chain reaction, and the product was cloned into the pDrive cloning system with the following primers: forward 5'GGAAGATCTC-CACCATGAATCCCGACCTGGACACCG3' and reverse 5'CCGGAATCCAAACTGCCCGGGCCAG3'. α_{1B} Δstop

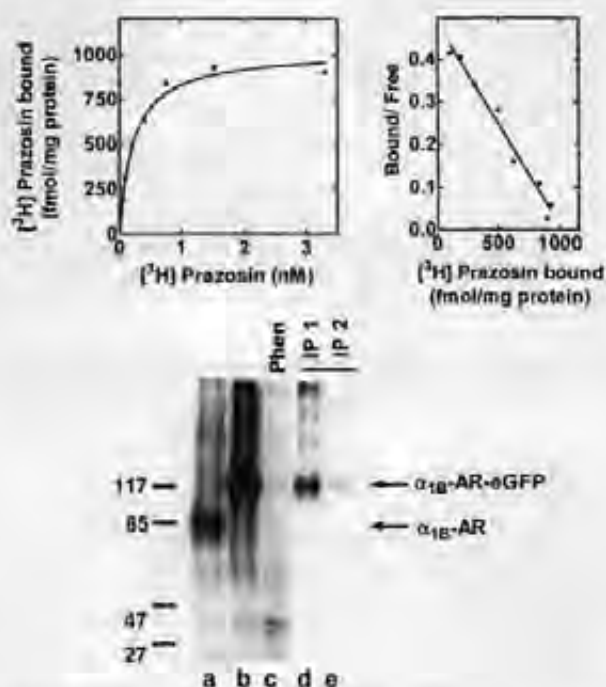


Fig. 1. Characterization of the α_{1B} -adrenoceptors fused to eGFP expressed in rat-1 fibroblasts. Upper panels: representative [³H] prazosin saturation isotherm and Scatchard transformation of the data. Bmax 990 fmol/mg of membrane protein, K_{17} 0.18 nM. Lower panel: Photoaffinity labeling (lanes a–c) and immunoprecipitation (lanes d and e) of α_{1B} -adrenoceptors. Photoaffinity labeling of membranes from cells expressing α_{1B} -adrenoceptors (lane a, α_{1B} -AR). Photoaffinity labeling of membranes from cells expressing α_{1B} -adrenoceptors fused to eGFP (α_{1B} -AR-eGFP) in the absence (lane b) or presence of 10 μ M phenolamine (lane c, Phen). Immunoprecipitation of photolabeled α_{1B} -adrenoceptors fused to eGFP was performed using antiserum raised against eGFP (lane d, IP 1) or the carboxyl decadeptide of hamster α_{1B} -adrenoceptors (lane e, IP 2).

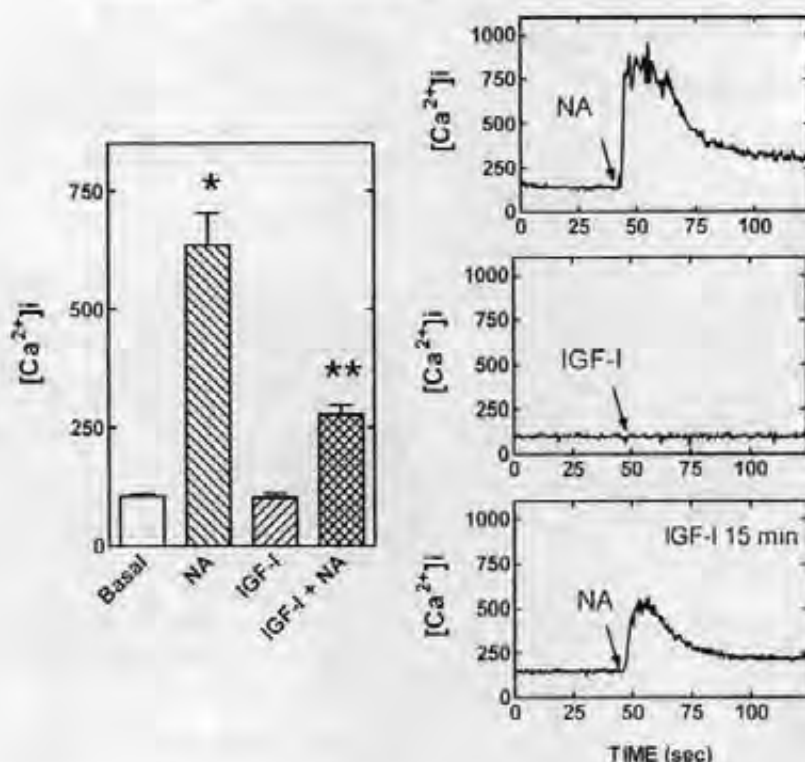


Fig. 2. Effect of IGF-I on α_{1B} -adrenergic-mediated increase in intracellular free calcium. Left panel: maximal intracellular calcium concentration observed after addition of vehicle (basal), 10 μ M noradrenaline (NA), 100 ng/ml IGF-I or 10 μ M noradrenaline in cells pre-incubated with 100 ng/ml IGF-I for 15 min (IGF-I + NA). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 7–8 determinations using different cell preparations. * $P < 0.001$ vs. all other groups. ** $P < 0.01$ vs. basal and IGF-I. Right panels: representative tracings.

DNA was inserted into BglII/EcoRI sites of pEGFP-N1 vector (Clontech) to generate a receptor tagged at the C terminus with eGFP. Plasmid nucleotide sequences were verified by double-stranded DNA sequencing performed at our Institute's Molecular Biology Unit.

2.3. Cell line

Rat-1 fibroblasts obtained from the American Type Culture Collection, were used for this study because they have no detectable α_{1B} -adrenoceptors or responses to noradrenaline (data not shown). Cells were transfected with the plasmid containing the previously described human α_{1B} -adrenoceptor-eGFP sequence, with Lipofectamine according to the manufacturer's instructions, and were cultured in the following selection media: glutamine-containing high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 900 μ g/ml of the neomycin analog, G-418 sulfate, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B at 37 $^{\circ}$ C under a 95% air/5% CO_2 atmosphere. Several clones were isolated and were screened for α_{1B} -adrenergic responsiveness (noradrenaline-induced increase in intracellular calcium concentration). The clone with the best response was selected for this study and further cultured in the media described above, but with reduced G-418 (300 μ g/ml). All experiments were performed utilizing this cell line that stably expresses α_{1B} -adrenoceptor-eGFP construction.

2.4. Receptor binding

Membranes were prepared as described (Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). Binding studies were performed by incubating [3 H]Prazosin (0.025–8 nM) with

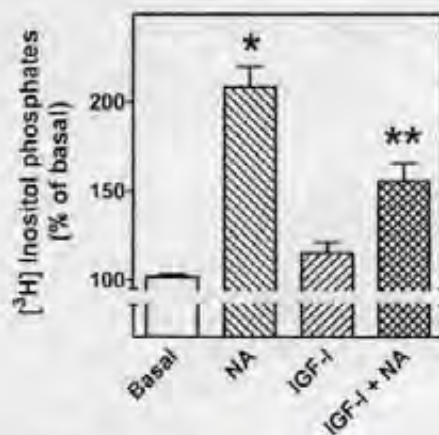


Fig. 3. Effect of IGF-I on α_{1B} -adrenergic-mediated [3 H] inositol phosphate production. [3 H] inositol labeled cells were incubated in presence of vehicle (basal), 10 μ M noradrenaline (NA), 100 ng/ml IGF-I or 100 ng/ml IGF-I + 10 μ M noradrenaline (IGF-I + NA) as indicated in Materials and methods. Plotted are the means, and vertical lines represent the S.E.M. of 5–6 experiments using different cell preparations. * $P < 0.001$ vs. basal, ** $P < 0.001$ vs. basal or NA and $P < 0.01$ vs. IGF-I.

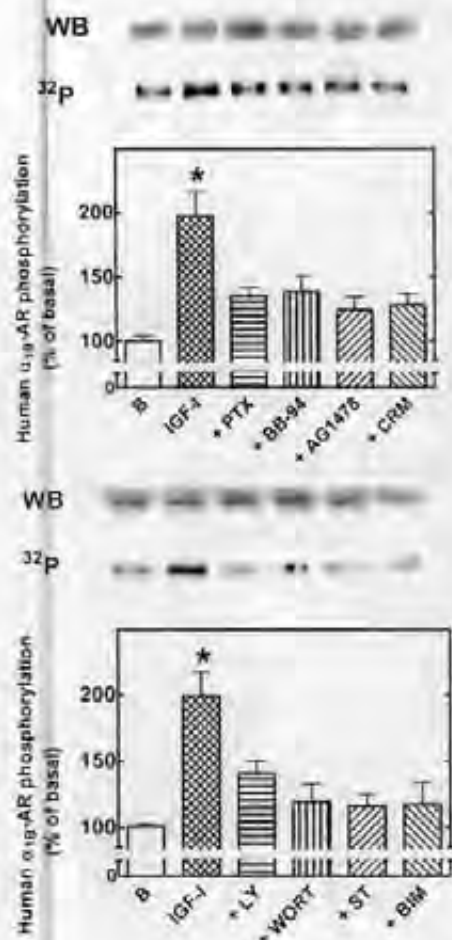


Fig. 4. Effect of IGF-1 on α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation. Cells were incubated with vehicle (B, basal) or challenged with 100 ng/ml IGF-1 for 15 min (all remaining groups). Pre-incubation was overnight with 100 ng/ml of pertussis toxin (\pm PTX), for 2 h with diphtheria toxin mutant CRM 197 (200 ng/ml) (\pm CRM), or for 30 min with the remaining indicated agents: 10 μ M BB-94 (\pm BB-94), 5 μ M AG1478 (\pm AG1478), 1 μ M LY 294002 (\pm LY), 100 nM wortmannin (\pm WORT), 1 μ M staurosporine (\pm ST) or 1 μ M bis-indolyl-maleimide 1 (\pm BIM). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 6–8 experiments using different cell preparations. * $P < 0.001$ vs. all remaining groups. Representative autoradiographs of phosphorylated receptor (32 P) and α_{1B} -adrenoceptor Western blots (WB) are presented.

membranes (15–20 μ g of protein) in a final volume of 0.25 ml of binding buffer (Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.5) for 60 min at 25 °C in a water bath shaker. Incubation was ended by addition of 5 ml of ice-cold binding buffer and filtration through GF/C filters using a Brandel harvester. Filters were washed twice, and dried, and radioactivity was measured in a liquid scintillation counter. Non-specific binding was determined in presence of 10 μ M phentolamine; specific binding was >90% of total binding at the K_D . The EBDA program (Biosoft-Elsevier) was used to analyze saturation curves.

2.5. Photoaffinity labeling

Membranes (250 μ g protein), were incubated in the dark with 6 nM of [¹²⁵I]-aryl]-azido-prazosin and exposed to

ultraviolet light as described (Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). After this treatment membranes were centrifuged, washed, solubilized and subjected to electrophoresis in 7.5% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions.

2.6. Intracellular free calcium [Ca^{2+}]_i measurements

Cells were incubated overnight in Dulbecco's modified Eagle's medium without serum and antibiotics and were loaded with 4 μ M 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 (Molina-Muñoz et al., 2006; Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000) with an Aminco-Bowman Series 2 Spectrometer with excitation monochromator set at 340 and 380 nm; a 0.5 s chopper interval was employed, and the emission monochromator was set at 510 nm. [Ca^{2+}]_i was calculated as described (Grynkiewicz et al., 1985) using the software provided by Aminco-Bowman; traces were directly exported to the graphs.

2.7. [³H]inositol phosphate production

Cells were labeled with [³H]inositol (5 μ Ci/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 pre-incubated 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 stopped by addition of 2 ml of chloroform/methanol (1:2 v/v); samples were thoroughly mixed and centrifuged in a clinical centrifuge. Aqueous phase was recovered and total [³H]inositol phosphates were separated by Dowex AG1-X8 chromatography (Berridge et al., 1983).

2.8. α_{1B} -Adrenoceptor phosphorylation

The procedure employed to study α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation in rat-1 fibroblasts has been described previously in detail (Molina-Muñoz et al., 2006; Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). In the present work the same procedure was used but a rabbit antiserum raised in our laboratory against eGFP was used. In brief, the day after transfection cells were collected by trypsinization and transferred to six-well dishes, cells were maintained overnight in phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium without serum. The following day, cells were maintained in phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium for 1 h and then incubated in 1 ml of the same medium containing [³²P]-orthophosphate (50 μ Ci/ml) for 3 h at 37 °C. Labeled cells were stimulated as indicated, washed with ice-cold phosphate-buffered saline, and solubilized with 0.5 ml of ice-cold solubilization buffer containing 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate,

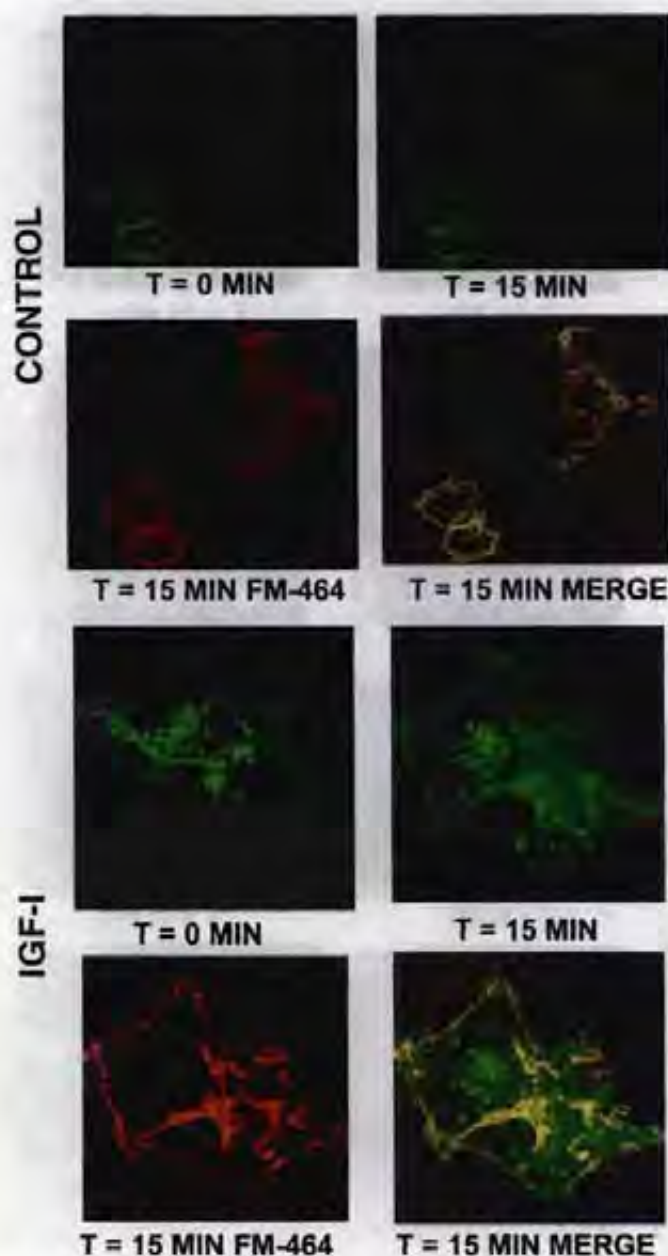


Fig. 5. Confocal images of rat-1 fibroblasts expressing α_{1A} -adrenoceptors fused to cGFP. Cells were incubated with vehicle (upper group of images) or with 100 ng/ml IGF-I (lower group of images) for the times indicated. FM-464 (red) was used as a plasma membrane marker.

10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM p-serine, 1 mM p-threonine, 1 mM p-tyrosine, and protease inhibitors (Molina-Muñoz et al., 2006; Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). Cell lysates were centrifuged at 12,700 $\times g$ for 15 min at 4 °C and supernatants were incubated with the indicated antiserum and protein A-Sepharose overnight at 4 °C. After four washes with 50 mM HEPES, 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 100 mM NaF, the immune complexes were boiled for 5 min in

SDS-sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol, and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Gels were dried and exposed for 18–24 h and receptor phosphorylation was assessed with a Molecular Dynamics PhosphorImager and Imagequant software (Amersham Biosciences). Data fell within the linear range of detection of the apparatus and were plotted using Prism 4 from GraphPad software. Recovery of the immunoprecipitated receptor was reproducible as evidenced by Western blotting and no correction for recovery was performed.

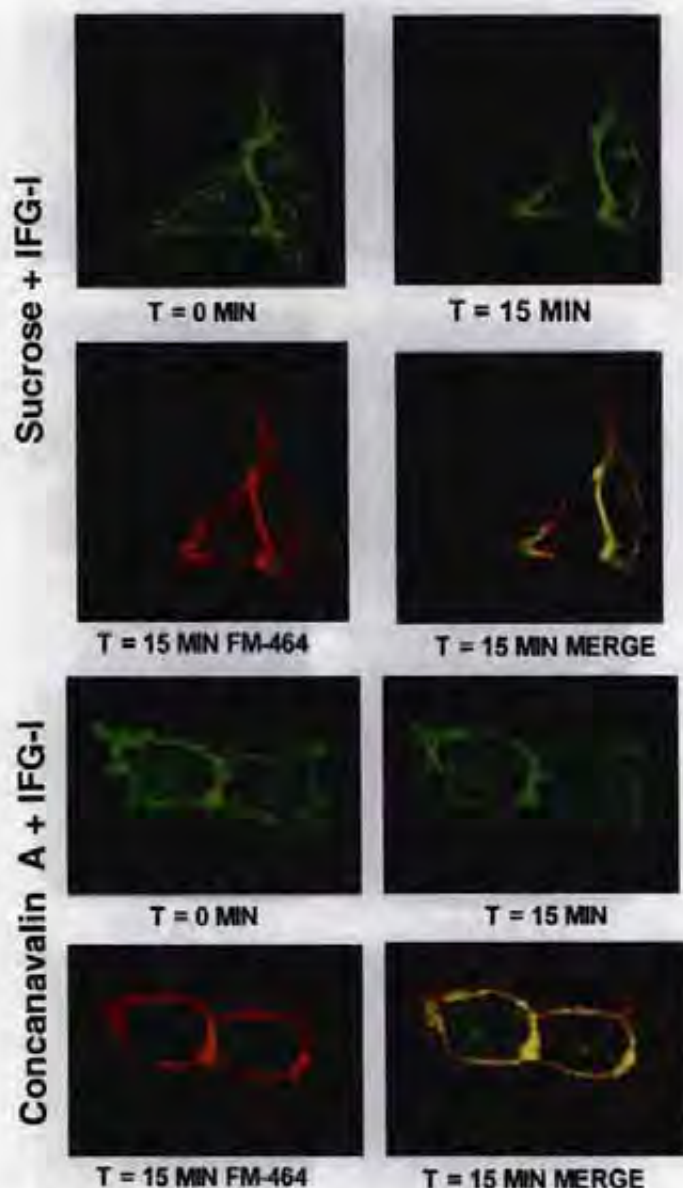


Fig. 6. Confocal images of rat-1 fibroblasts expressing α_{1B} -adrenoceptors fused to eGFP. Cells were pre-incubated with 0.4 M sucrose (upper group of images) or concanavalin A (0.25 μ g/ml) for 30 min and then challenged with 100 ng/ml IGF-I for the times indicated. FM-464 (red) was used as a plasma membrane marker.

2.9. Confocal microscopy

Confocal images were obtained using a Flowview FV 1000 laser confocal system (Olympus) attached/interfaced to an Olympus IX81 inverted light microscope with a 40 \times glycerol-immersion objective. eGFP was excited using the 488 nm line of a krypton/argon laser, and the emitted fluorescence was detected with a 515–540 nm band pass filter. Operating the laser at a low power setting (97–99% attenuation) substantially reduced photobleaching and photodamage. Confocal images were viewed and processed using FV10-ASW 1.6 software (Olympus). FM-464 was used as a plasma membrane marker.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis between comparable groups was performed using ANOVA with Newman–Keuls analysis and was performed with the software included in the GraphPad Prism program.

3. Results

As indicated in Materials and methods, a cell line stably expressing α_{1B} -adrenoceptors tagged with eGFP at the carboxyl tail was isolated. These cells express α_{1B} -adrenoceptors at a density of 900–1600 fmol/mg membrane protein with high

affinity for [^3H]prazosin (Kd 0.2–0.3 nM) (Fig. 1). Membranes from cells expressing non-tagged $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptors (used as a control) or from cells expressing eGFP-tagged receptors were photolabeled with [^{125}I -aryl]-azido-prazosin, solubilized and subjected to polyacrylamide gel electrophoresis. Photolabeled non-tagged $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptors were identified as a band with relative molecular mass of ≈ 80 –85 kDa, in agreement with previous observations (García-Sáinz et al., 1999; Vázquez-Prado et al., 1997; Vázquez-Prado et al., 2000). A major band with a relative molecular mass of ≈ 115 –120 kDa was photolabeled in membranes from eGFP-tagged $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor-expressing cells (Fig. 1). This is the expected molecular mass considering that the eGFP mass is ≈ 27 kDa. Labeling specificity was confirmed with the use of phentolamine. Photolabeled receptor immunoprecipitation was achieved using two antibodies, one generated against eGFP and another against the terminal carboxyl decapeptide of hamster α_1 -adrenoceptors (Vázquez-Prado et al., 1997), which is capable of immunoprecipitating human α_1 -adrenoceptors (García-Sáinz et al., 1999). As shown in Fig. 1, both antisera were able to immunoprecipitate the tagged receptor, but that generated against eGFP was more effective (15–20% of total photolabeled receptors) than the one against the receptor carboxyl tail (1–2%); therefore, in all subsequent experiments the former antiserum was utilized. The relative low efficacy of the antiserum generated against the hamster receptor carboxyl terminal decapeptide is not surprising, considering that it is less able to immunoprecipitate the human receptor (García-Sáinz et al., 1999) and the possible esteric restrictions imposed by the fused protein. No receptor immunoprecipitation is observed with non-immune serum (not shown) (see Vázquez-Prado et al., 1997).

We next examined the functional response of these cells and data are presented in Figs. 2 and 3. It can be observed that noradrenaline (10 μM) induced a nearly immediate increase in intracellular free calcium concentration and that IGF-I did not modify the resting intracellular concentration of this cation (Fig. 2). Nevertheless, when cells were pre-incubated with IGF-I for 15 min and then challenged with noradrenaline, response to the catecholamine was markedly decreased (Fig. 2). Similar results were obtained when production of [^3H] inositol phosphates from [^3H] inositol labeled cells was studied, i.e., noradrenaline markedly increased inositol phosphate production, and IGF-I induced a very small, statistically insignificant, increase but markedly decreased adrenergic action (Fig. 3). These data extend the observation that IGF-I induces functional desensitization of hamster $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptors to the human receptor.

Receptor phosphorylation was subsequently examined and the data are presented in Fig. 4. In agreement with our previous findings on studying hamster $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptors, IGF-I induced a clear increase in the human adrenoceptor phosphorylation state (Fig. 4). This IGF-I effect was markedly attenuated in pertussis toxin-incubated cells (100 ng/ml overnight or 300 ng/ml for 3 h). Similarly, this growth factor action was inhibited by BB-94 (a metalloproteinase inhibitor), AG1478 (an inhibitor of EGF receptor intrinsic tyrosine kinase), diphtheria toxin mutant CRM 197 and by inhibitors of phosphoinositide 3-kinase (LY294002 and wortmannin) and protein kinase C activities

(staurosporine and bis-indoly-maleimide I) (Fig. 4). None of these agents modified basal $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor phosphorylation by themselves (data not shown).

Because the enhanced fluorescent protein was attached to the receptor's carboxyl terminus, the possibility that it could be phosphorylated by IGF-I action was considered. However, this was not the case. No phosphorylation of free eGFP (i.e., not fused to the receptor) was detected in rat-1 cells that expressed it (expression was confirmed by confocal fluorescent microscopy and by immunoblotting) (data not shown).

Taking advantage of the fluorescent tag we studied $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor location and tested the possibility that the action of IGF-I might lead to their internalization. Human $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor-fused eGFP was localized at the plasma membrane level and also in relatively large vesicles (Fig. 5). Cell treatment with IGF-I induced a reduction of fluorescence at the plasma membrane level and accumulation into vesicles around the nucleus; this process was relatively fast, taking place within 10–15 min (Fig. 5 and also see Supplementary material "Movie"). Hypertonic sucrose markedly decreases clustering of surface receptors into endosomes (Daukas and Zigmond, 1985) and blocks receptor internalization (Walker et al., 1999). IGF-I-induced $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor internalization was blocked by this treatment (Fig. 6). Similarly cell incubation with concanavalin A (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 30 min), an inhibitor of receptor sequestration inhibited IGF-I-induced $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor internalization (Fig. 6). In contrast, we were unable to detect any clear action of chloroquine (a lysosomal-proteolysis inhibitor) on this parameter (data not shown).

4. Discussion

Previously we showed that IGF-I induces desensitization and phosphorylation of hamster $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptors (Molina-Muñoz et al., 2006). This manuscript extends this observation to the human receptor and demonstrates that the action of IGF-I leads to $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor internalization. Hamster and human $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptors are very similar but some differences exist (SWISS-PROT: P35368 and P18841). Cottechia and coworkers (Diviani et al., 1997; Lattion et al., 1994) have elegantly shown that the main phosphorylation sites for protein kinase C and G protein-coupled receptor kinases are located in the carboxyl terminus. This domain is present in both human and hamster $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptors but human adrenoceptor carboxyl terminus is four amino acids larger than that of the hamster and lacks a potential site for protein kinase C. Despite these differences, the results obtained with the human receptor are very similar to those using hamster $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptors.

The signaling cascade triggered by IGF-I that leads to $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor phosphorylation and desensitization is complex and not yet completely defined. In agreement with our previous work, we observed that the increase in $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenoceptor phosphorylation induced by IGF-I is pertussis toxin-sensitive. This indicates a role of G proteins (likely through their $\beta\gamma$ subunits (Molina-Muñoz et al., 2006)). Their role is clear but the manner in which this takes place is not. IGF-I exerts its actions through the type I IGF receptor a transmembrane

tyrosine kinase similar to the insulin receptor (Adams et al., 2000). G proteins are usually associated with seven transmembrane domain receptors, nonetheless there is evidence that certain receptors with a single transmembrane domain, including those with tyrosine kinase activity, can interact with G proteins, which might mediate some of their actions (reviewed in Patel, 2004). Therefore, the possibility of a direct G protein activation by IGF-I receptor remains open. On the other hand, there is growing evidence suggesting that many hormones and neurotransmitters induce sphingosine kinase activation, with generation of sphingosine-1-phosphate, which acts in an autocrine loop through G protein-coupled receptors (Hobson et al., 2001; Pyne and Pyne, 2000, 2002; Spiegel and Milstien, 2007; Sukocheva et al., 2006; Sukocheva et al., 2003). Therefore, indirect IGF-I receptor interaction with G proteins is also likely. These two possibilities are not mutually exclusive, and it is clear that further research is needed to clarify the pathway(s) through which the effect of IGF-I on α_{1B} -adrenoceptors takes place.

The effect of BB-94 (a general metalloproteinase inhibitor), the diphtheria toxin mutant CRM 197 (that binds with high affinity to HB-EGF and blocks its action) and of tyrphostin AG1478 (inhibitor of the EGF receptor tyrosine kinase activity) are consistent with the idea that HB-EGF shedding and EGF receptor transactivation play a role in this effect. Similarly, roles of phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C were strongly indicated by the effects of these inhibitors.

The following sequence of events has been proposed (Molina-Muñoz et al., 2006) and is consistent with the present findings: a) IGF-I receptor activation stimulates, directly or indirectly, pertussis toxin-sensitive G proteins, b) these in turn activate metalloproteinases, which catalyze heparin-binding EGF shedding, and EGF receptor transactivation c) dissociated G $\beta\gamma$ subunits and phosphotyrosine residues appears to trigger phosphoinositide 3-kinase activity, which leads to protein kinase C activation, this resulting in α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation and desensitization.

It has been frequently observed that G protein-coupled receptor phosphorylation is associated with internalization, and agonist-induced receptor internalization is a well-known phenomenon. Taking advantage of the possibility of visualizing receptor internalization in living cells by using fluorescent reagents such as eGFP, Tsujimoto and coworkers (Fukunaga et al., 2006) elegantly showed that the order of potency of agonists and antagonists for receptor internalization corresponded well with that observed in radioligand binding experiments. Such data suggest that monitoring agonist-induced receptor internalization could be considered as a novel pharmacological approach for characterizing receptors (Fukunaga et al., 2006).

Our present data indicate that heterologous desensitization of α_{1B} -adrenoceptors is associated with phosphorylation and internalization. This is consistent with previous observations indicating that protein kinase C activation induces α_{1B} -adrenoceptor internalization (Cowlen and Toews, 1988; Fonseca et al., 1995). It is interesting that differences have been observed in homologous- and heterologous desensitization-associated receptor internalization processes (Cowlen and

Toews, 1988; Rapacciuolo et al., 2003). In DDT1 MF-2 cells, agonists and active phorbol esters induced α_{1B} -adrenoceptor internalization and the combination of both stimuli was additive (Cowlen and Toews, 1988; Rapacciuolo et al., 2003).

Differences in cellular location and internalization, among α_1 -adrenoceptor subtypes have been reported (Chalothorn et al., 2002; McCune et al., 2000; Pediani et al., 2005; Rapacciuolo et al., 2003; Wang et al., 2007). The most prominent feature comprises that a large proportion of α_{1D} -adrenoceptors are located in intracellular vesicles, whereas α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors are located in high density in plasma membrane and also in internal vesicles (Chalothorn et al., 2002; McCune et al., 2000; Morris et al., 2004; Pediani et al., 2005; Rapacciuolo et al., 2003; Wang et al., 2007). α_{1D} -Adrenoceptor internalization has been observed but is difficult to demonstrate (McCune et al., 2000; Wang et al., 2007). Agonists induce internalization of α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors associated with β -arrestins and it has been shown that a dominant-negative mutant of this protein blocks this effect (Chalothorn et al., 2002; McCune et al., 2000). Interestingly, α_{1A} -adrenoceptor cellular traffic is very active, continuous and agonist-independent (Morris et al., 2004; Pediani et al., 2000); this constitutive internalization was not observed for α_{1B} -adrenoceptors (Morris et al., 2004; Pediani et al., 2000). Essentially, no information is available on α_1 -adrenoceptor internalization in response to non-adrenergic agents (hormones, neurotransmitters or growth factors).

IGF-I is a small 70-amino acid peptide produced in liver and other organs in response to growth hormone, and it mediates the majority of its actions, playing a key role in fetal and post-natal growth and development (Adams et al., 2000; Laron, 2001). There are many cells that endogenously co-express the IGF-I receptors and adrenoceptors; however, their crosstalk has not been studied in many systems. The work of Malbon and coworkers has characterized in detail the molecular entities involved in IGF-I-mediated functional desensitization, phosphorylation, and internalization of β_1 - and β_2 -adrenoceptors (Fan et al., 2001; Gavi et al., 2006; Gavi et al., 2007; Hadcock et al., 1992). Our present and previous data (Molina-Muñoz et al., 2006) indicate that α_{1B} -adrenoceptor function, phosphorylation state and cellular location are influenced by IGF-I action. It is clear that for both β_2 - and α_{1B} -adrenoceptors, the acute action of IGF-I attenuated their responsiveness. However, there are similarities and differences in the molecular mechanisms involved. In the case of the effect of IGF-I on β_2 -adrenoceptors, tyrosine-residue phosphorylation appears to be of cardinal importance (Gavi et al., 2006; Karoor and Malbon, 1996) whereas the serine/threonine kinase, protein kinase C, plays such a key role for action of this growth factor on α_{1B} -adrenoceptors (Molina-Muñoz et al., 2006). A common player for these effects is the activity of phosphoinositide 3-kinase (Molina-Muñoz et al., 2006) and it is likely that other molecular entities (such as kinases or adaptors) might participate in these processes. It is worthwhile mentioning that phosphoinositide 3-kinase possesses dual activity as a phosphoinositide and as a protein kinase and it has been elegantly shown that both activities are important for G protein-coupled receptor endocytosis (Naga Prasad et al., 2005).

Acknowledgements

We thank Dr. Araceli Patrón Soberano and Gabriel Orozco Oyuela for their technical support with confocal microscopy images, Christian C. Colín Santana for his help with generation of anti-eGFP antibody and MVZ Héctor Malagón for his help in our animal care facility. This work was supported by Grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (45837-Q and 4-294) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN200206).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejphar.2007.08.047.

References

- Adams, T.E., Fpa, V.C., Garrett, T.P., Ward, C.W., 2000. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1050–1093.
- Bernalde, 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. *Biochim. J.* 212, 473–482.
- Casas-González, P., García-Sáinz, J.A., 2006. Role of epidermal growth factor receptor transactivation in α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* 542, 31–36.
- Casas-González, P., Ruiz-Martínez, A., García-Sáinz, J.A., 2003. Lysophosphatidic acid induces α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation through G $\beta\gamma$, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochim. Biophys. Acta* 1633, 75–83.
- Casas-González, P., Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A., 2000. Lysophosphatidic acid modulates α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation and function: roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* 57, 1027–1033.
- Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.* 66, 61–79.
- Cowlen, M.S., Toews, M.L., 1988. Evidence for alpha 1-adrenergic receptor internalization in DDT1 MF-2 cells following exposure to agonists plus protein kinase C activators. *Mol. Pharmacol.* 54, 340–346.
- Chalothorn, D., McCune, D.F., Edelmann, S.E., García-Cazarrá, M.L., Tsujimoto, G., Plasek, M.T., 2002. Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the α_1 -adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 61, 1008–1016.
- Daukas, G., Zigmond, S.H., 1985. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 101, 1673–1679.
- Diviani, D., Lattion, A.L., Cotecchia, S., 1997. Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α_{1B} -adrenoceptor. *J. Biol. Chem.* 272, 28712–28719.
- Fan, G., Shumay, E., Wang, H., Malbon, C.C., 2001. The scaffold protein gravin (cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein 250) binds the beta 2-adrenergic receptor via the receptor cytoplasmic Arg-329 to Leu-413 domain and provides a mobile scaffold during desensitization. *J. Biol. Chem.* 276, 24005–24014.
- Fonseca, M.L., Bolton, D.C., Brown, R.D., 1995. Agonist regulation of alpha 1B-adrenergic receptor subcellular distribution and function. *J. Biol. Chem.* 270, 8902–8909.
- Fukunaga, S., Setoguchi, S., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., 2006. Monitoring ligand-mediated internalization of G protein-coupled receptor as a novel pharmacological approach. *Life Sci.* 30, 17–23.
- García-Sáinz, J.A., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado, J., Romero-Ávila, M.T., 1999. Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human α_{1B} -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 385, 263–271.
- García-Sáinz, J.A., Romero-Ávila, M.T., Molina-Muñoz, T., Medina, L.C., 2004. Insulin induces α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation and desensitization. *Life Sci.* 75, 1937–1947.
- García-Sáinz, J.A., Romero-Ávila, M.T., Ruiz-Arruga, A., Ruiz-Puente, J., Aguiñaga, C., Ortiz, V., Iribasi, A., 1992. Characterization and detoxification of an easily prepared acellular pertussis vaccine. Antigenic role of the A protomer of pertussis toxin. *Vaccine* 10, 341–344.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., 2000. α_1 -Adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* 389, 1–12.
- Gavi, S., Shumay, E., Wang, H.Y., Malbon, C.C., 2006. G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 48–54.
- Gavi, S., Yin, D., Shumay, E., Wang, H.Y., Malbon, C.C., 2007. Insulin-like growth factor-I provokes functional antagonism and internalization of β_1 -adrenoceptors. *Endocrinol.* 148, 2653–2662.
- González-Arenas, A., Aguilar-Maldonado, B., Avendaño-Vázquez, S.E., García-Sáinz, J.A., 2006. Estrogens cross-talk to α_{1B} -adrenoceptors. *Mol. Pharmacol.* 70, 154–162.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- 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. *J. Biol. Chem.* 267, 26017–26022.
- Hobson, J.P., Rosenfeld, H.M., Barak, L.S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2001. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291, 1800–1803.
- Karoor, V., Malbon, C.C., 1996. Insulin-like growth factor receptor-1 stimulates phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor in vivo on sites distinct from those phosphorylated in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 271, 29347–29352.
- Laron, Z., 2001. The history and impact of the International Bellinson Symposium. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 14, 573–574.
- Lattion, A.L., Diviani, D., Cotecchia, S., 1994. Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenoceptor. *J. Biol. Chem.* 269, 22887–22893.
- McCune, D.F., Edelmann, S.E., Olges, J.R., Post, G.R., Waldrop, B.A., Waugh, D.J., Perez, D.M., Plasek, M.T., 2000. Regulation of the cellular localization and signaling properties of the α_{1B} - and α_{1C} -adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol. Pharmacol.* 57, 659–666.
- Medina, L.C., Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A., 2000. Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and α_{1B} -adrenoceptors. *Biochem. J.* 350, 413–419.
- 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 α_{1B} -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett.* 422, 141–145.
- Molina-Muñoz, T., Romero-Ávila, M.T., García-Sáinz, J.A., 2006. Insulin-like growth factor-I induces α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation through G beta gamma and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Endocrinol.* 20, 2773–2783.
- Morris, D.P., Price, R.R., Smith, M.P., Lei, B., Schwinn, D.A., 2004. Cellular trafficking of human alpha1-adrenergic receptors is continuous and primarily agonist-independent. *Mol. Pharmacol.* 66, 843–854.
- Naga Prasad, S.V., Javittfleke, A., Madananchi, A., Rockman, H.A., 2005. Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 7, 785–796.
- Patel, T.B., 2004. Single transmembrane spanning heterotrimeric G protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol. Rev.* 56, 371–385.
- Pediani, J.D., Colton, J.F., Caldwell, D., Milligan, G., Daly, C.J., McGrath, J.C., 2005. β -Arrestin-dependent spontaneous α_{1A} -adrenoceptor endocytosis causes intracellular transportation of α -blockers via recycling compartments. *Mol. Pharmacol.* 67, 992–1004.
- Pediani, J.D., MacKenzie, J.F., Heeley, R.P., Daly, C.J., McGrath, J.C., 2000. Single-cell recombinant pharmacology: bovine α_{1A} adrenoceptors in rat-1 fibroblasts release intracellular Ca^{2+} , display subtype-characteristic agonism

- and antagonism, and exhibit an antagonist-reversible inverse concentration-response phase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 887–895.
- Perrin, R.B., Protin, A.N., Benovic, J.L., 2000. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 81–89.
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J., 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653–692.
- Pyne, S., Pyne, N.J., 2000. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J.* 349, 385–402.
- Pyne, S., Pyne, N.J., 2002. Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 121–131.
- Rapacciuolo, A., Suvama, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L.M., Cong, M., Lefkowitz, R.J., Rockman, H.A., 2003. Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J. Biol. Chem.* 278, 35403–35411.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2007. Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *J. Biol. Chem.* 282, 2125–2129.
- Sukocheva, O., Wadham, C., Holmes, A., Albanese, N., Verrier, E., Feng, F., Bernal, A., Derian, C.K., Ullrich, A., Vadas, M.A., Xia, P., 2006. Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J. Cell Biol.* 173, 301–310.
- Sukocheva, O.A., Wang, L., Albanese, N., Pitson, S.M., Vadas, M.A., Xia, P., 2003. Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 17, 2002–2012.
- Vázquez-Prado, J., Casas-González, P., García-Sáinz, J.A., 2003. G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell. Signal.* 15, 549–557.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., García-Sáinz, J.A., 1997. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of α_{1B} -adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 27330–27337.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero-Ávila, M.T., González-Espinosa, C., García-Sáinz, J.A., 2000. Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of α_{1A} -adrenergic receptors: Functional aspects. *J. Biol. Chem.* 275, 6553–6559.
- Walker, J.K., Premont, R.T., Barak, L.S., Caron, M.G., Sletznine, M.A., 1999. Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta (2)-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 31515–31523.
- Wang, S.Y., Song, Y., Xu, M., He, Q.H., Han, Q.D., Zhang, Y.Y., 2007. Internalization and distribution of three α_1 -adrenoceptor subtypes in HEK293A cells before and after agonist stimulation. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 359–366.

Insulin-Like Growth Factor-I Induces α_{1B} -Adrenergic Receptor Phosphorylation through $G\beta\gamma$ and Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation

Tzindilú Molina-Muñoz, María Teresa Romero-Ávila, and J. Adolfo García-Sáinz

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

IGF-I induces α_{1B} -adrenoceptor (α_{1B} -AR) phosphorylation. The effect of IGF-I was rapid and transient, reaching near-maximal values at 10 min and decreasing after 30 min; it was observed at low IGF-I concentrations ($EC_{50} = 10$ ng/ml) and was associated to receptor desensitization as evidenced by a decreased α_{1B} -adrenergic effect on intracellular calcium and production of inositol phosphates. The effect of IGF-I was markedly decreased in cells treated with pertussis toxin suggesting involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins. Transfection of the carboxyl terminus of the β -adrenergic receptor kinase or the $\Delta p85$ mutant of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) markedly decreased the α_{1B} -AR phosphorylation induced by IGF-I without decreasing the receptor phosphorylation induced by noradrenaline. Inhibitors of PI3K and protein kinase C blocked IGF-I-induced α_{1B} -AR phosphorylation. In addition, it was ob-

served that AG1478, an inhibitor of the epidermal growth factor (EGF) receptor kinase, and BB-94, a metalloproteinase inhibitor, also diminished IGF-I-induced adrenoceptor phosphorylation.

The data clearly show that IGF-I triggers a complex signaling pathway, which leads to the phosphorylation and desensitization of a serpentine G protein-coupled receptor, suggesting the following hypothetical model: 1) stimulation of IGF-I receptors activate pertussis toxin-sensitive G proteins; 2) the growth factor action activates metalloproteinases, which catalyze heparin binding-EGF shedding, and transactivation of EGF receptors, and 3) dissociated $G\beta\gamma$ subunits and phosphotyrosine residues seem to trigger PI3K activity, which leads to activation of protein kinase C, resulting in α_{1B} -AR phosphorylation and desensitization. (*Molecular Endocrinology* 20: 2773-2783, 2006)

THE α_1 -ADRENOCEPTORS (α_1 -ARs) MEDIATE many physiological actions of adrenaline and noradrenaline, playing key roles in the functions of the cardiovascular, genitourinary, and central nervous systems (1-4). They also participate in the pathogenesis of diseases such as hypertension or benign prostatic hypertrophy (1-4). These receptors, i.e. the α_{1A} -, α_{1B} -, and α_{1D} -AR subtypes, constitute a branch of the adrenergic subfamily of the seven-transmembrane domains G protein-coupled receptors. Knowledge of molecular events that control their function is of major physiological importance and current ideas indicate that phosphorylation, via G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and second messenger-dependent kinases such as protein kinase C (PKC), is one of the earliest processes in their regulation (1-4).

α_{1B} -ARs have been more extensively studied than the other subtypes. GRK2 and GRK3 appear to be involved in phosphorylation of agonist-occupied α_{1B} -ARs during homologous desensitization (5, 6), whereas PKC and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) seem to play major roles in heterologous desensitization (1, 7).

Activation of nonadrenergic receptors has been observed to induce α_{1B} -AR desensitization (heterologous desensitizations) and phosphorylation. Thus, activation of seven-transmembrane domains receptors coupled to $G_{\alpha_{i1}}$ (such as endothelin ET_A (8) or bradykinin BK2 receptors (9)), or to G_i (such as lysophosphatidic acid receptors (10, 11), or receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, such as insulin (12), epidermal growth factor (EGF), or platelet-derived growth factor (PDGF) receptors (13)) can also induce α_{1B} -AR phosphorylation/desensitization. Recent evidence indicates that EGF receptor transactivation also seems to play a key general role in α_{1B} -AR phosphorylation/desensitization (11, 45).

As previously indicated, activation of receptors with intrinsic protein tyrosine kinase activity, induce α_{1B} -AR phosphorylation/desensitization (12, 13). In the present work, we studied the effect of IGF-I on α_{1B} -ARs. The study was inspired by the physiological im-

First Published Online June 27, 2006

Abbreviations: α_1 -AR, α_1 -Adrenoceptor; β -ARK, β -adrenergic receptor kinase; EGF, epidermal growth factor; GRK, G protein-coupled receptor kinase; HB-EGF, heparin-binding EGF; PDGF, platelet-derived growth factor; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C.

Molecular Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

importance of this factor and the peculiarities of its signaling. IGF-I mediates most of the actions of GH, including its anabolic and mitogenic activities (14, 15). It plays a critical role in normal fetal and postnatal growth and development. Inactivation of the *Igf-1* gene results in dwarfism at birth, retarded postnatal growth, and infertility in mice (14, 16, 17). Similarly, it has been observed that mutations in the GH receptor gene result in a new type of dwarfism indistinguishable from GH deficiency characterized by high values of serum GH (Laron syndrome) (15). IGF-I is a small 70-amino acid peptide (produced in liver and other organs), which signals through the IGF-I receptor, a transmembrane tyrosine kinase similar to the insulin receptor (17). Although the insulin receptor and that for IGF-I share some actions, they mediate different effects on metabolism and cell proliferation and differentiation. Such differences may in part be attributed to the tissue distribution of those receptors, but structural differences in their β -subunits might also participate by determining the substrate specificity of their tyrosine kinases (17-19). Some tyrosine kinase receptors seem to couple to G proteins (20). IGF-I receptors couple to heterotrimeric G proteins, particularly of the G_i family (Refs. 21 and 22; reviewed in Ref. 20). It has also been suggested that IGF-I receptors recruit EGF receptors

as a signaling pattern (14, 23). Our data clearly show that IGF-I triggers a complex signaling pathway, which leads to the phosphorylation and desensitization of α_{1B} -ARs in a process that involves pertussis toxin-sensitive G proteins, transactivation of EGF receptors, and activation of PI3K and PKC. In addition, we observed that such pathway might also be shared by other receptors with endogenous tyrosine kinase activity.

RESULTS

As shown in Fig. 1, *left panel*, IGF-I induced a clear increase in α_{1B} -AR phosphorylation in a concentration-dependent fashion; the maximal increase was of ~3-fold with an EC_{50} value of 13 ± 2 ng/ml (mean \pm SEM; $n = 5$). The effect was rapid, being clearly observable as early as 2 min after the addition of IGF-I, reached a plateau between 10 and 30 min, and decreased thereafter (Fig. 1, *right panel*).

The functional consequences of the IGF-I action on α_{1B} -ARs were next examined. It was observed that IGF-I induced a small (nonsignificant) increase in the production of [3 H]inositol phosphates (Fig. 2, *upper*

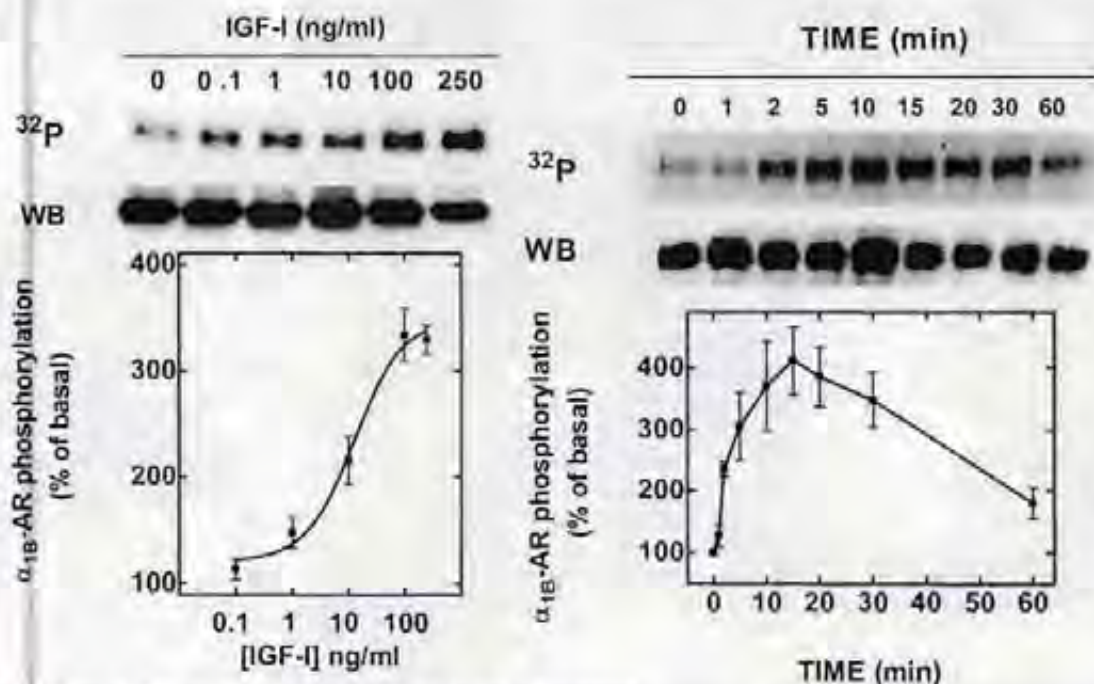


Fig. 1. Effect of IGF-I on α_{1B} -AR Phosphorylation in Rat-1 Fibroblasts

Rat-1 fibroblasts were metabolically labeled with [32 P]Pi, stimulated for 15 min with the agents indicated below, and lysed. α_{1B} -ARs were immunoprecipitated and subjected to electrophoresis and autoradiography. *Left panel*, Concentration response curve. Cells were incubated for 15 min in the presence of the indicated concentration of IGF-I. *Right panel*, Time course of the effect. Cells were incubated for the times indicated in the presence of 100 ng/ml IGF-I. Plotted are the means, and vertical lines represent the SEM of four to five experiments using different cell preparations. Representative autoradiographs are shown above the graphs (32 P) (entire-gel autoradiographs are presented in supplemental data 1, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://mend.endojournals.org>), and Western blot detection of immunoprecipitated α_{1B} -ARs of samples run in parallel are also shown (WB).

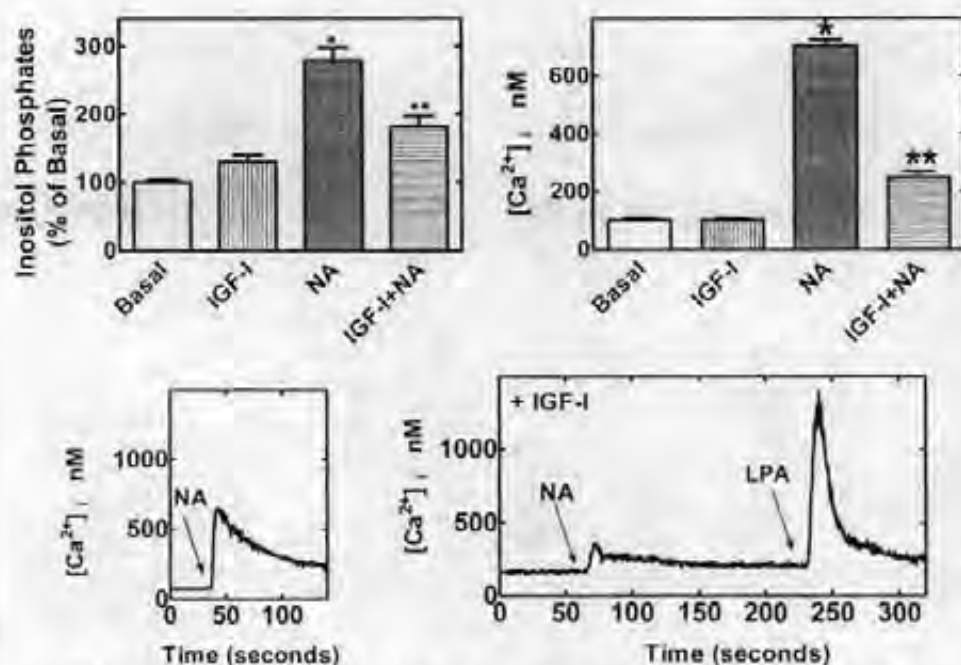


Fig. 2. Effect of IGF-I on α_{1B} -AR-Mediated [³H]inositol Phosphate Production and Intracellular Calcium Concentration

Upper panels. Cells were labeled with [³H]inositol and challenged, and the production of [³H]inositol phosphates was determined by ion exchange chromatography as described in *Materials and Methods*. Cells were incubated in the absence of any agent (Basal) or presence of 100 ng/ml IGF-I, 10 μ M noradrenaline (NA), or both agents (IGF-I + NA). Plotted are the means, and vertical lines represent the SEM of five experiments using different cells preparations. *, $P < 0.001$ vs. basal; **, $P < 0.001$ vs. noradrenaline alone. **Lower panels.** Cells were loaded with fura 2, and intracellular calcium was determined fluorometrically as described in *Materials and Methods*; representative tracings of cells preincubated in the absence (*left*) or presence of 100 ng/ml IGF-I (*right*) for 15 min (time 0); when indicated, 10 μ M noradrenaline (NA) or 1 μ M lysophosphatidic acid (LPA) was added.

left panel). Noradrenaline markedly increases [³H]-inositol phosphate production, and this action was clearly decreased by pretreatment with IGF-I. The effect on intracellular calcium concentration was examined, and we observed that IGF-I did not induce any clear change by itself on the basal level (Fig. 2, *right upper panel*). As expected, noradrenaline induced an immediate sharp increase, which after a few seconds started to decrease toward near-basal levels (Fig. 2, *lower left panel*). When cells were pretreated with IGF-I for 15 min and then challenged with noradrenaline, the action of the adrenergic amine was markedly reduced (Fig. 2, *right panels*). Such action was not due to a general perturbation of the calcium signaling process as evidenced by the ability of lysophosphatidic acid to increase the intracellular calcium concentration in a marked and immediate fashion (Fig. 2, *lower panel*).

Because the IGF-I receptor mediates some of its actions through activation of G proteins of the G_i family (20–22), we tested whether the α_{1B} -AR phosphorylation induced by IGF-I was sensitive to the action of pertussis toxin. In the experiments shown in Fig. 3, cells were preincubated with pertussis toxin for 12 h to ensure complete ADP-ribosylation of toxin-sensitive G proteins (8). The effect of IGF-I on α_{1B} -AR phosphorylation was markedly attenuated. As expected, the effect of noradrenaline on α_{1B} -AR phosphorylation

was not significantly altered by the pertussis toxin pretreatment and that of lysophosphatidic acid was markedly reduced (8, 10), which served as negative and positive controls, respectively (Fig. 3, *left panel*). Similar results were obtained after preincubation for 2 h with the toxin (data not shown). Then, we tested the possibility that the α_{1B} -AR phosphorylation induced by other receptors with endogenous protein tyrosine kinase activity could also involve pertussis toxin-sensitive G proteins, and in fact this was the case. As is shown in Fig. 3, *right panel*, the α_{1B} -AR phosphorylation induced by insulin, EGF, and PDGF were strongly diminished in cells pretreated with pertussis toxin. Nevertheless, it should be made clear that in no case was the effect completely abolished.

Activation of G_i proteins by the lysophosphatidic acid LPA₁ receptor induces α_{1B} -AR phosphorylation via the shedding of membrane-bound heparin-binding EGF (HB-EGF) by metalloproteinases, which leads to the autocrine activation of EGF receptors, triggering activation of PI3K and PKC (11). The possibility that a similar process could be involved in the action of IGF-I was considered, and we tested the roles of metalloproteinases and protein kinases through the use of inhibitors. In agreement with previous findings, BB-94 (batimastat), a broad spectrum metalloproteinase inhibitor, markedly attenuated the α_{1B} -AR phosphoryla-

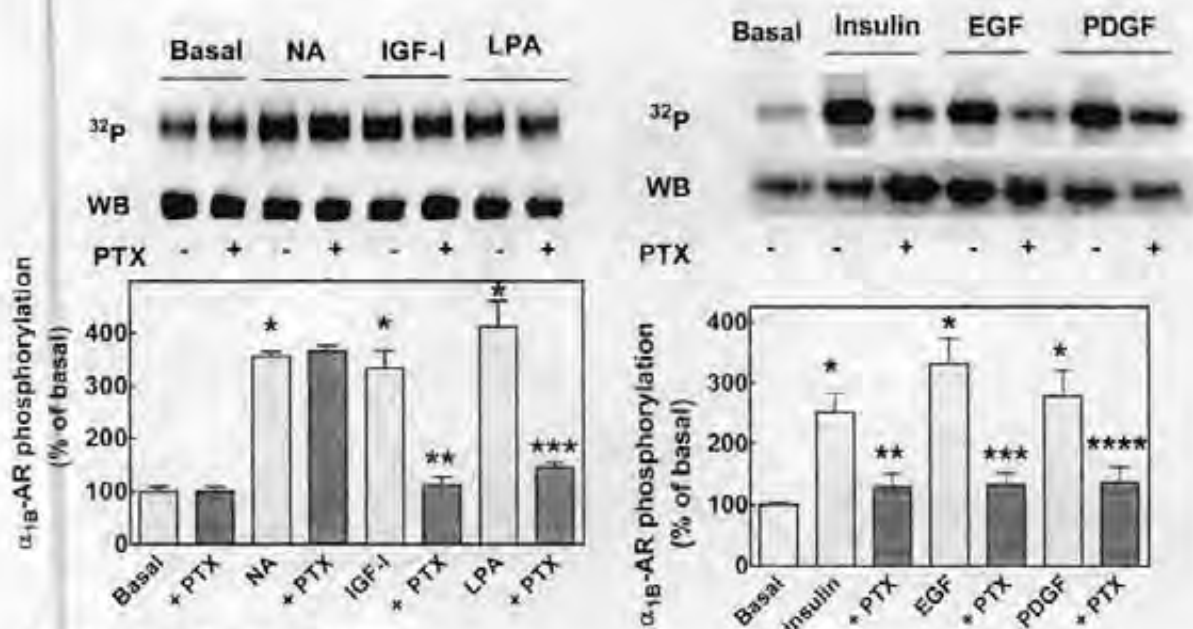


Fig. 3. Effect of Pertussis Toxin Treatment

Left panel. Rat-1 fibroblasts were preincubated for 12 h in the absence (dotted bars) or presence (crosshatched bars) of 100 ng/ml pertussis toxin and challenged with 10 μ M noradrenaline (NA), 100 ng/ml IGF-I, or 1 μ M lysophosphatidic acid (LPA). Plotted are the means, and vertical lines represent the SEM of four to five experiments using different cell preparations. A representative autoradiograph is presented. Basal α_{1B} -AR labeling was not affected by pertussis toxin treatment. *, $P < 0.01$ vs. basal labeling; **, $P < 0.001$ vs. IGF-I alone; ***, $P < 0.001$ vs. lysophosphatidic acid alone. *Right panel.* Rat-1 fibroblasts were preincubated for 12 h in the absence (dotted bars) or presence (crosshatched bars) of 100 ng/ml pertussis toxin and challenged with 100 nM insulin, 100 ng/ml EGF, or 50 ng/ml PDGF. Plotted are the means, and vertical lines represent the SEM of four to five experiments using different cell preparations. A representative autoradiograph (32 P) and Western blot (WB) detection of immunoprecipitated α_{1B} -ARs of samples run in parallel are shown. *, $P < 0.001$ vs. basal labeling; **, $P < 0.05$ vs. insulin alone; ***, $P < 0.01$ vs. EGF alone; ****, $P < 0.05$ vs. PDGF alone.

tions induced by lysophosphatidic acid (11), noradrenaline (45), and IGF-I, but not that induced by the addition of EGF (Fig. 4, upper left panel). These data suggested that EGF receptor activation could participate in the process. AG1478, a selective inhibitor of the EGF receptor tyrosine kinase activity, diminished the α_{1B} -AR phosphorylations induced by noradrenaline, EGF, and IGF-I, which is consistent with the previous data (Fig. 4, upper right panel). It was similarly observed that inhibitors of PI3K, *i.e.* wortmannin and LY294002, and inhibitors of PKC, *i.e.* staurosporin and Ro 318220, inhibited the α_{1B} -AR phosphorylation induced by IGF-I. Inhibitors were without effect at the concentrations tested on basal receptor phosphorylation (data not shown). To show the participation of HB-EGF in these actions, we took advantage of the availability of a neutralizing anti-HB-EGF antibody. This antibody did not alter basal α_{1B} -AR phosphorylation (11) or that induced by tetradecanoyl phorbol acetate but strongly inhibited the action of lysophosphatidic acid (11) (Fig. 5). The neutralizing antibody markedly reduced the α_{1B} -AR phosphorylation induced by IGF-I, indicating a role of HB-EGF in this action.

We took a further step by using molecular biological approaches. Cos-1 cells were used, because they al-

lowed cotransfection experiments (11). We observed expression of α_{1B} -ARs in the range of 1–1.5 fmol/mg of membrane protein in these cells as observed previously (11). These receptors were functional as evidenced by [3 H]inositol phosphate production (data not shown) and were phosphorylated in response to noradrenaline and IGF-I (Fig. 6, upper left panel).

The carboxyl terminus of GRK2 [β -adrenergic receptor kinase (β -ARK)] is a powerful tool to study the role of G protein subunits *in vivo*, because it is capable of binding and sequestering the $\beta\gamma$ subunits of G proteins (24). In cells cotransfected with the carboxyl terminus of β -ARK and α_{1B} -ARs, the adrenoceptor phosphorylation induced by noradrenaline was not altered, whereas that induced by IGF-I was markedly diminished (Fig. 6, upper right panel). To further confirm the role of PI3K, we took advantage of the dominant-negative mutant of the regulatory subunit (Δ p85). Cotransfection of the adrenoceptor with this PI3K mutant did not alter the α_{1B} -AR phosphorylation induced by noradrenaline but markedly reduced the effect of IGF-I on this parameter (Fig. 6, lower right panel). Wild-type p85 PI3K altered neither the effect of noradrenaline nor that of IGF-I (Fig. 6, lower left panel). Expression of α_{1B} -ARs, the carboxyl terminus of β -ARK, Δ p85 and p85 was confirmed by Western blot

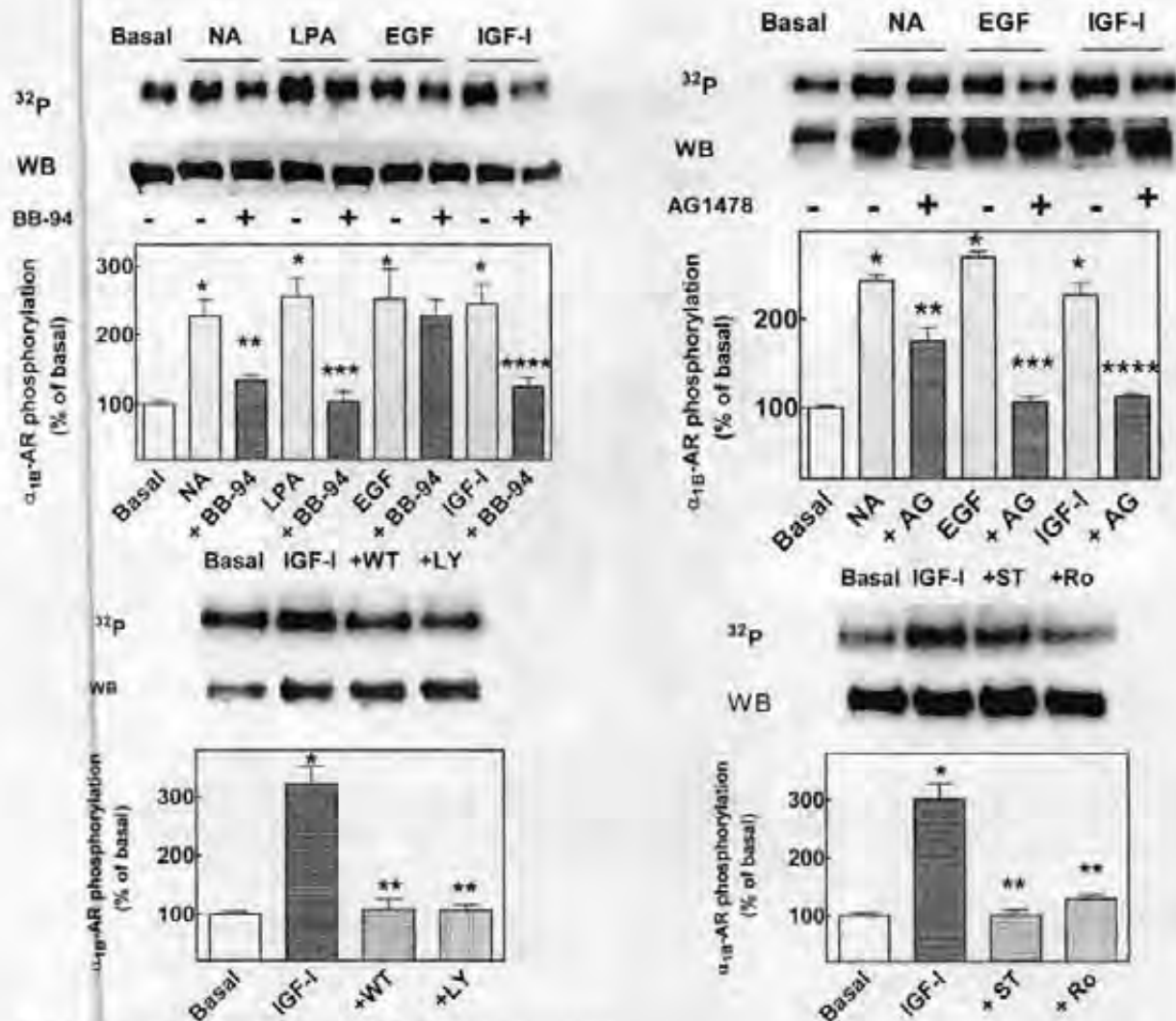


Fig. 4. Effect of Metalloproteinase and Protein Kinase Inhibitors

Upper left panel. Rat-1 fibroblasts were incubated for 30 min in the absence (dotted bars) or presence of 10 μ M BB-94 (Batimastat) (crisscrossed bars), and then challenged with 10 μ M noradrenaline (NA), 1 μ M lysophosphatidic acid (LPA), 100 ng/ml EGF, or 100 ng/ml IGF-I. A representative autoradiograph is presented. Basal α_{1B} -AR labeling was not affected by BB-94. *, $P < 0.01$ vs. basal labeling; **, $P < 0.05$ vs. noradrenaline alone; ***, $P < 0.01$ vs. lysophosphatidic acid alone; ****, $P < 0.05$ vs. IGF-I alone. *Upper right panel.* Rat-1 fibroblasts were incubated for 30 min in the absence (dotted bars) or presence of 5 μ M AG1478 (crisscrossed bars), and then challenged with 10 μ M noradrenaline (NA), 100 ng/ml EGF, or 100 ng/ml IGF-I. A representative autoradiograph (32 P) and Western blot (WB) detection of immunoprecipitated α_{1B} -ARs of samples run in parallel are shown. Basal α_{1B} -AR labeling was not affected by AG1478. *, $P < 0.001$ vs. basal labeling; **, $P < 0.01$ vs. noradrenaline alone; ***, $P < 0.001$ vs. EGF alone; ****, $P < 0.001$ vs. IGF-I alone. *Lower panels.* Rat-1 fibroblasts were incubated for 30 min in the absence of any agent or presence of 100 nM wortmannin (+WT), 1 μ M LY 294002 (+LY), 1 μ M staurosporin (+ST), or 1 μ M Ro 318220 (+Ro), and then challenged with 100 ng/ml IGF-I or vehicle (basal). A representative autoradiograph (32 P) and Western blot (WB) detection of immunoprecipitated α_{1B} -ARs of samples run in parallel are shown. The inhibitors did not alter basal α_{1B} -AR labeling. *, $P < 0.001$ vs. basal labeling; **, $P < 0.01$ vs. IGF-I alone.

analysis (see supplemental data 2, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://mend.endojournals.org>).

The effect of IGF-I on α_{1B} -AR phosphorylation and desensitization was also studied in DDT, MF-2 cells, which endogenously express both IGF-I receptors and α_{1B} -ARs. As shown in Fig. 7, in DDT, MF-2 cells, noradrenaline induced a marked increase in intracel-

lular calcium; IGF-I did not alter this parameter by itself but markedly reduced the effect of noradrenaline. In addition, we observed that IGF-I also induced α_{1B} -AR phosphorylation in these cells and that such effect is blocked by pertussis toxin treatment, AG1478, BB-94, and the anti-HB-EGF neutralizing antibody (Fig. 8). Neither the antibody nor the inhibitors alter basal α_{1B} -AR phosphorylation (data not shown).

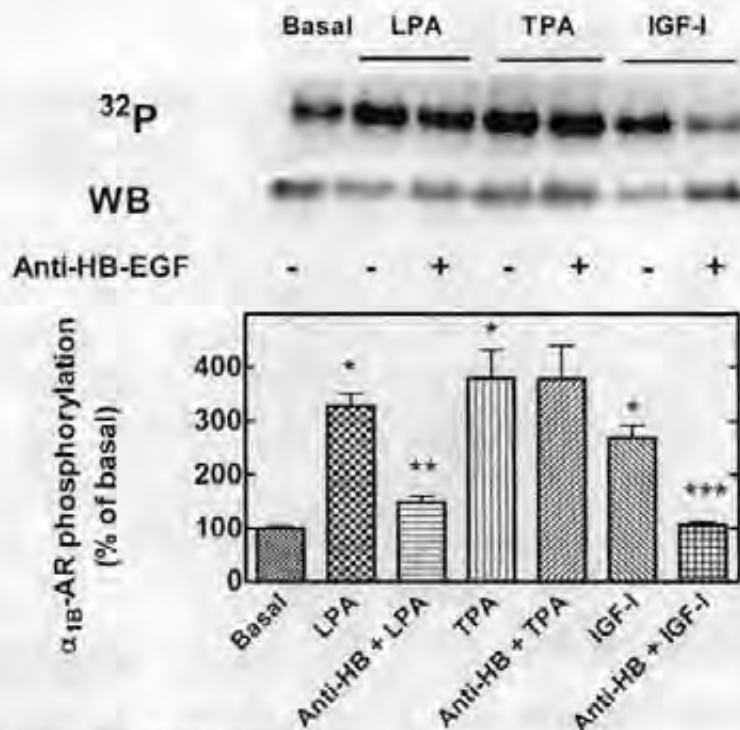


Fig. 5. Effect of a Neutralizing Anti-HB-EGF Antibody

Rat-1 fibroblasts were incubated in the absence or presence of 5 μ g/ml of anti-HB-EGF antibody (Anti-HB) for 15 min, and then challenged with in the indicated agents for another 15 min, and receptor phosphorylation was determined as indicated in *Materials and Methods*. Agents were as follows: 1 μ M lysophosphatidic acid (LPA), 1 μ M tetradecanoyl phorbol acetate (TPA), and 100 ng/ml IGF-I. A representative autoradiograph (32 P) and Western blot (WB) detection of immunoprecipitated α_{1B} -ARs of samples run in parallel are shown. *, $P < 0.001$ vs. basal labeling; **, $P < 0.001$ vs. lysophosphatidic acid alone; ***, $P < 0.01$ vs. IGF-I alone.

DISCUSSION

In the present paper, we documented the ability of IGF-I to induce α_{1B} -AR phosphorylation and desensitization, rapidly and at relatively low concentrations. This action of IGF-I showed similarities and differences with that of insulin (12, 13). Insulin induced a hardly detected functional desensitization of α_{1B} -ARs in Rat-1 fibroblast, although clear functional desensitization was evidenced in DDT₁-FM2 cells (12). In contrast, as shown here, IGF-I clearly desensitized α_{1B} -ARs in both cell lines. The data comparing these different cell lines indicated that the cellular context plays a role in defining the functional consequences of the hormone action. Many factors may account for this difference, among them the following: the relative density of the receptors for these hormones, the specificity of their substrates and their availability, and the relative coupling to the G proteins present in the cells. The data further show similarities and differences in action between insulin and IGF-I.

It is generally assumed that seven-transmembrane domains receptors are the G protein-coupled receptors. Obviously, this is an oversimplification. It is known that some receptors with a single transmembrane domain, including those with tyrosine kinase activity, can also interact with G proteins, which in turn mediate some of their actions (reviewed in Ref. 20). In

this context, these receptors should be considered also as G protein coupled (20). Despite all of this information, it was surprising that pertussis toxin inhibited IGF-I-induced α_{1B} -AR phosphorylation to such an extent. This led us to explore and discover that the actions of insulin, EGF, and PDGF on this parameter, were also sensitive to pertussis toxin. It is important to emphasize that pertussis toxin did not block completely the effects of these growth factors, which indicates that G proteins are not the sole mediators of the effects and that, likely, the tyrosine kinase activity of these receptors and the formation of phosphotyrosine residues on their target proteins might also play a role (see below). This is similar to what we have observed with lysophosphatidic acid-induced α_{1B} -AR phosphorylation, which involves the conjunction of two signaling pathways (11).

Our present results allow us to conclude that IGF-I-induced α_{1B} -AR phosphorylation also involves transactivation of EGF receptors by an autocrine loop, involving metalloproteinase activation and shedding of HB-EGF. There is already some evidence indicating that cross talk of IGF-I receptors and EGF receptors, through autocrine loops, could be relevant for some actions (14, 23). Thus, IGF-I induced activation of MAPKs can be blocked by inhibitors of the EGF receptor tyrosine kinase, in Cos-7 cells (23). It has also been shown that this effect is abolished by [Glu²⁵]diphtheria

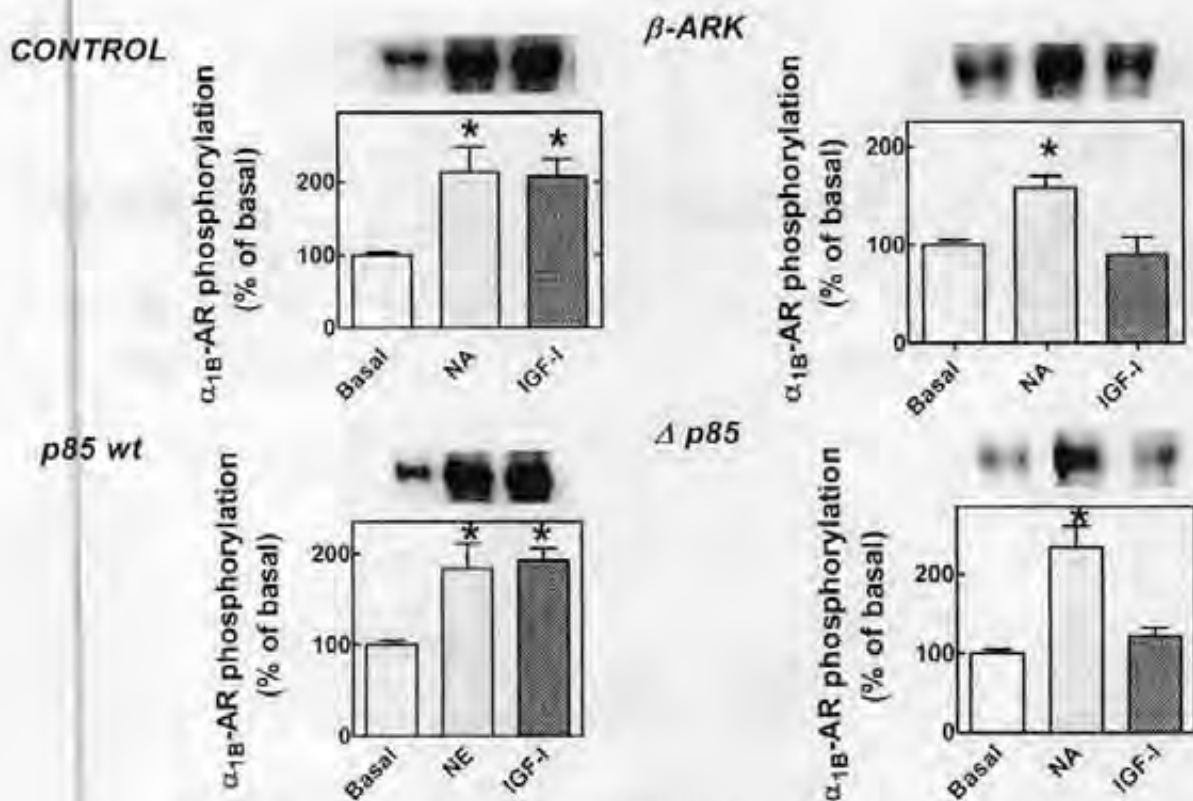


Fig. 6. Effect of Cotransfection with the Carboxyl Terminus of β -ARK, Wild-Type p85 PI3K, or the Dominant-Negative Mutant Δ p85 PI3K on IGF-I-Mediated α_{1B} -AR Phosphorylation

Cos-1 cells were cotransfected with the α_{1B} -AR and one of the following: β -galactosidase (control cells) (upper left panel), the carboxyl terminus of β -ARK (upper right panel), wild-type p85 α (lower left panel), or Δ p85 α (lower right panel). Incubations were for 5 min for 10 μ M noradrenaline (NA) and 15 min for 100 ng/ml IGF-I. Plotted are the means \pm SEM of five to six determinations using different cell preparations. A representative autoradiograph is shown for each condition. Western blot (WB) detection of transfected proteins is presented in supplemental data 2 (published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://mend.endo.sagepub.com>). * $P < 0.001$ vs. basal.

toxin (an inhibitor of HB-EGF) and by 1,10-phenanthroline (a metal chelator and broad inhibitor of metalloproteinases) (23). Ullrich and co-workers (25–27) made the landmark observation that activation of seven-transmembrane domains G protein-coupled receptors induces the transactivation of EGF receptors, through the shedding of HB-EGF by metalloproteinases, and that such effect is involved in some of their actions. Our present findings and those of Roudabush *et al.* (23) indicate that such concept likely can be extended to receptor tyrosine kinases and other receptors that couple to G proteins. It is very probable that such process might have physiological (cell proliferation and differentiation) and pathological (cancer) implications, particularly in the case of IGF-I whose landmark action is a potent inhibition of apoptosis (14).

The ability of pertussis toxin to block the here-described effects indicated that G proteins, likely of the Gi subfamily, were involved in the action of IGF-I, but gave no clue to whether α -subunits, the G $\beta\gamma$ complexes, or both mediate the effect. The experiments in which the carboxyl terminus of β -ARK was expressed strongly suggest that G $\beta\gamma$ complexes mediate to a

large extent this effect. Our data also indicate the participation of two kinases, PI3K and PKC.

PI3K is a family of enzymes comprising three major classes (I–III) that have been implicated in very diverse cellular functions including cell cycle progression, cell growth, cell adhesion, survival and intracellular trafficking of proteins, among many others (28, 29). It was initially considered that class I α PI3Ks mediated actions of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, whereas class I β (PI3K γ) mediated actions of G protein-coupled receptors via G $\beta\gamma$ subunits (30–32). However, it was soon observed that PI3K γ has a very discrete pattern of expression and that therefore it is not present in the vast majority of cells (30–32) and that G protein-coupled receptors can induce tyrosine phosphorylation-independent activation of class I α PI3Ks by G protein $\beta\gamma$ dimers (33). Cos-1 cells express PI3K α and PI3K β (30). Our data using either pertussis toxin treatment or transfection of β -ARK strongly suggest that G $\beta\gamma$ activate PI3K α/β isoforms. PI3K Δ p85 is a dominant-negative mutant (34) that occupies phosphotyrosine residues but lacks the p110-binding site, *i.e.* it blocks the phosphotyrosine binding sites

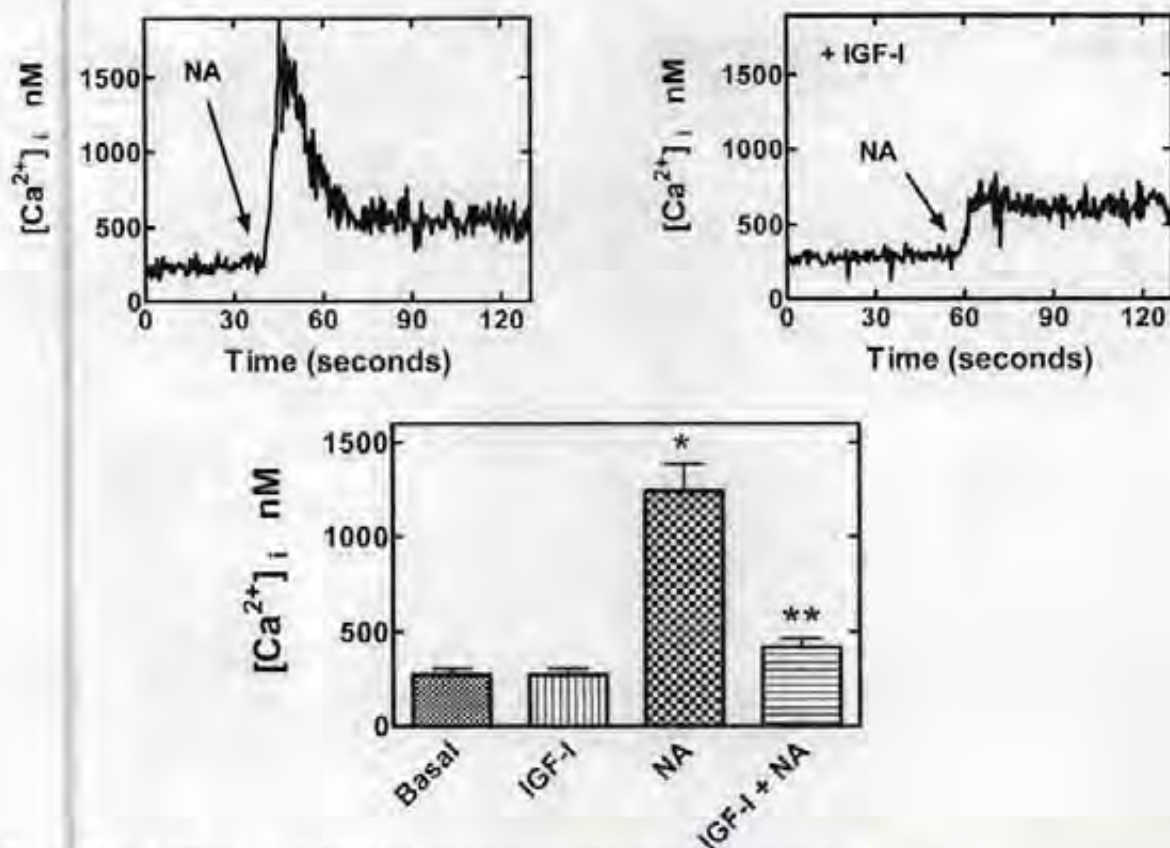


Fig. 7. Effect of IGF-I on α_{1B} -AR-Mediated Increase in Intracellular Calcium Concentration

DDT-MF-2 cells were loaded with fura 2, and intracellular calcium was determined fluorometrically as described in *Materials and Methods*; representative tracings of cells preincubated in the absence (*left*) or presence of 100 ng/ml IGF-I (*right*) for 15 min (time 0; where indicated, 10 μ M noradrenaline (NA) was added. Representative tracings are presented in the upper panels, and the mean \pm SEM of four to five determinations using different cell preparations are plotted in the lower panel. *, $P < 0.001$ vs. basal; **, $P < 0.001$ vs. noradrenaline alone.

normally occupied by endogenous PI3K. The data in cells expressing $\Delta p85$ suggested that the phosphotyrosine-p85 association was important, indicating that both phosphotyrosine residues and $G\beta\gamma$ play roles. This is consistent with the observation that PI3K isoforms consisting of p85 and p110 β are synergistically activated by the $G\beta\gamma$ subunits and phosphotyrosine-containing peptides (33).

Inhibitors of PKC and PI3K essentially blocked the effect of IGF-I, suggesting that these kinases acted in a sequence and not through independent pathways. PI3K is a modulator of PKC activity through synthesis of 3-phosphorylated phosphoinositides. These lipids modulate phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1), which phosphorylates the activation loop of some PKC isoforms; in addition, 3-phosphorylated phosphoinositides have also been reported to activate novel and atypical PKC isoforms (35, 36). Therefore, it is likely that PI3K may activate PKC through PDK-1, the generation of 3-phosphoinositides, or both processes.

PKC is a large family of enzymes with differences in sensitivity to activators and substrate specificity (37),

and there is a large body of experimental evidence indicating that PKC phosphorylates α_{1B} -ARs. However, there is no direct evidence concerning isoform(s) that participate in α_{1B} -AR phosphorylation. Nevertheless, we have observed that, in Rat-1 cells, α , δ , and ϵ isoforms of PKC coimmunoprecipitate with α_{1B} -ARs under basal conditions and that such an association is dynamically increased by cell treatment with phorbol esters or hormones that increase receptor phosphorylation (38). These data indicate that several PKC isoforms participate in this process and suggest the possibilities that they may play roles at different steps or that functional redundancy may exist.

In summary, our data indicate that stimulation of IGF-I receptors activates pertussis toxin-sensitive G proteins. IGF-I action induces an autocrine loop with activation of metalloproteinases, HB-EGF shedding, and transactivation of EGF receptors. $G\beta\gamma$ dimers in synergism with the synthesis of phosphotyrosine residues seem to trigger PI3K activity, which leads to activation of PKC and this to α_{1B} -AR phosphorylation.

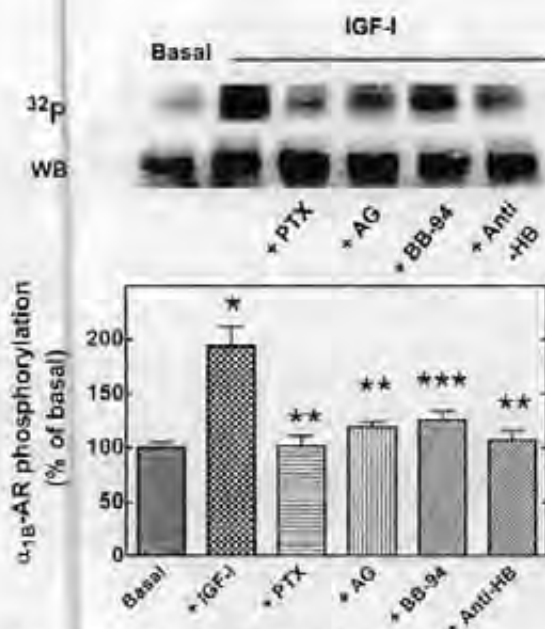


Fig. 8. Effect of IGF-I on α_{1B} -AR Phosphorylation in DDT, MF-2 Cells

Cells were metabolically labeled with [32 P]Pi, stimulated for 15 min with the agents indicated below, and lysed; α_{1B} -ARs were immunoprecipitated and subjected to electrophoresis and autoradiography. Cells were treated with pertussis toxin (+PTX) at 100 ng/ml 12 h before the experiment was performed. The inhibitors, 5 μ M AG1478 (+AG), 10 μ M BB-94 (+BB-94), and 5 μ g/ml neutralizing anti-HB-EGF antibody (+Anti-HB), were added 15 min before the cells were challenged with 100 ng/ml IGF-I. A representative autoradiograph (32 P) and Western blot (WB) detection of immunoprecipitated α_{1B} -ARs of samples run in parallel are shown. *, $P < 0.001$ vs basal; **, $P < 0.001$ vs IGF-I alone; ***, $P < 0.01$ vs IGF-I alone.

MATERIALS AND METHODS

Materials

(-)-Norepinephrine, IGF-I, lysophosphatidic acid, staurosporin, wortmannin, and protease inhibitors were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). LY294002 and Ro 318220 were from Calbiochem (La Jolla, CA). Pertussis toxin was purified from vaccine concentrates as described (39). DMEM, fetal bovine serum, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from Invitrogen Life Technologies (San Diego, CA). [32 P]Pi (8500–9120 Ci/mmol), myo-[2,3- 3 H]inositol (22.9 Ci/mmol) and [3 H]prazosin (74.4 Ci/mmol) were from PerkinElmer Life Sciences (Wellesley, MA). Sepharose-coupled protein A was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), whereas BB-94 (Batimastat) was generously provided to us by Dr. S. Mobashery (40) (Wayne State University, Detroit, MI). DNA purification kits were from Qiagen (Hilden, Germany). Anti-GRK2 antibodies and anti-p85 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Chemiluminescence kits were from Pierce (Rockford, IL). Anti-heparin binding-EGF neutralizing antibodies were from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Cell Lines and Expression Plasmids

Rat-1 fibroblasts transfected with hamster α_{1B} -AR, generously provided to us by Drs. R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, and

L. Allen (Duke University, Durham, NC), were cultured in glutamine-containing high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 300 μ g/ml neomycin analog, G-418 sulfate, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B at 37 C under a 95% air/5% CO₂ atmosphere as described previously (8, 11, 12). Receptor density in this cell line was in the range of 1–1.5 pmol/mg membrane protein. Gos-1 and DDT, MF-2 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). These cells were cultured as described above but in the absence of G-418 sulfate. Transient transfection into Cos-1 cells was performed using diethylaminopethyl-dextran (41) as described (11). Cells at 90% confluence were transfected with a total of 6 μ g plasmid for each 10-cm petri dish, usually using 3 μ g plasmid containing the α_{1B} -AR cDNA and 3 μ g plasmid containing cDNAs coding the carboxyl terminus of β -ARK, wild-type PI3K, a dominant-negative PI3K mutant, or β -galactosidase (pCH110). Experiments with transient transfected cells were performed 48 h after transfection. Transfection efficiency (~50%) was determined in parallel dishes transfected with pCH110 and evaluated by β -galactosidase activity. Expression of proteins of interest was checked by Western blot analysis or [3 H]prazosin binding. Hamster α_{1B} -AR cDNA (42), kindly provided to us by Dr. R. J. Lefkowitz, was subcloned into pCNA3 as described (11). Plasmids SR α -p85 containing the cDNA of wild-type of p85 and SR α - Δ p85 containing cDNA of the dominant-negative mutant p85 α subunit of PI3K, lacking the p110 binding site, were kindly provided by Drs. W. Ogawa and M. Kasuga (Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan) (34). Plasmid pRK5 expressing the carboxyl terminus (β -binding domain) of β -ARK was kindly donated by Dr. W. Koch (Duke University, Durham, NC) (24).

Phosphorylation of α_{1B} -ARs

The antibody used and procedures employed to study α_{1B} -AR phosphorylation in Rat-1 fibroblasts, DDT, MF-2, and Cos-1 cells have been described previously in detail (8, 11, 12). In brief, the day after transfection, cells were collected by trypsinization and transferred to six-well dishes. Cells were maintained overnight in phosphate-free DMEM without serum. The following day, cells were maintained in phosphate-free DMEM for 1 h and then incubated in 1 ml of the same medium containing [32 P]orthophosphate (50 μ Ci/ml, Rat-1 cells; 75 μ Ci/ml, Cos-1 cells, and 150 μ Ci/ml, DDT, MF-2 cells) for 3–5 h at 37 C. Labeled cells were stimulated as indicated, washed with ice-cold PBS, and solubilized with 0.5 ml ice-cold solubilization buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 1 mM Na₂VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM p-serine, 1 mM p-threonine, 1 mM p-tyrosine, and protease inhibitors (11, 12). Cell lysates were centrifuged at 12,700 \times g for 15 min at 4 C, and supernatants were incubated with anti- α_{1B} -AR antiserum and protein A-Sepharose overnight at 4 C. After four washes with 50 mM HEPES, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl (pH 7.2), 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 100 mM NaF, the immune complexes were boiled for 5 min in SDS-sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol, and subjected to SDS-PAGE. Gels were dried and exposed for 18–24 h, and the level of receptor phosphorylation was assessed with a Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA) PhosphorImager and ImageQuant software (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Data fell within the linear range of detection of the apparatus and were plotted using Prism 3 from GraphPad Software (San Diego, CA). Equal loading of immunoprecipitated receptor was checked by Western blotting (data omitted for clarity; see Ref. 12).

[Ca²⁺]_i Measurements

Cells were incubated overnight in DMEM without serum and antibiotics and were loaded with 4 μ M fura 2-acetoxymethyl ester in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% BSA (pH 7.4) for 1 h at 37°C. Cells were detached by gentle trypsinization and fluorescence measurements were carried out as described previously (8, 12) with an Aminco-Bowman (Rochester, NY) 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 (43) 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 μ Ci/ml) for 16–24 h in inositol-free DMEM 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 chloroform/methanol (1.2 vol/vol); 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 (44).

Statistical analysis between comparable groups was performed using ANOVA with Newman-Keuls analysis and was effected with software included in the GraphPad Prism program.

Acknowledgments

We express our gratitude to Drs. Lefkowitz, Caron, Allen, Ogawa, Kasuga, and Koch for the indicated cells and plasmids and Dr. Mobashery for BB-94.

Received February 21, 2006. Accepted June 21, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: J. Adolfo García-Sáinz, M.D., Ph.D., Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, 04510 México D.F., México. E-mail: agarcia@ifc.unam.mx

This research was partially supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN200206) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (45837Q).

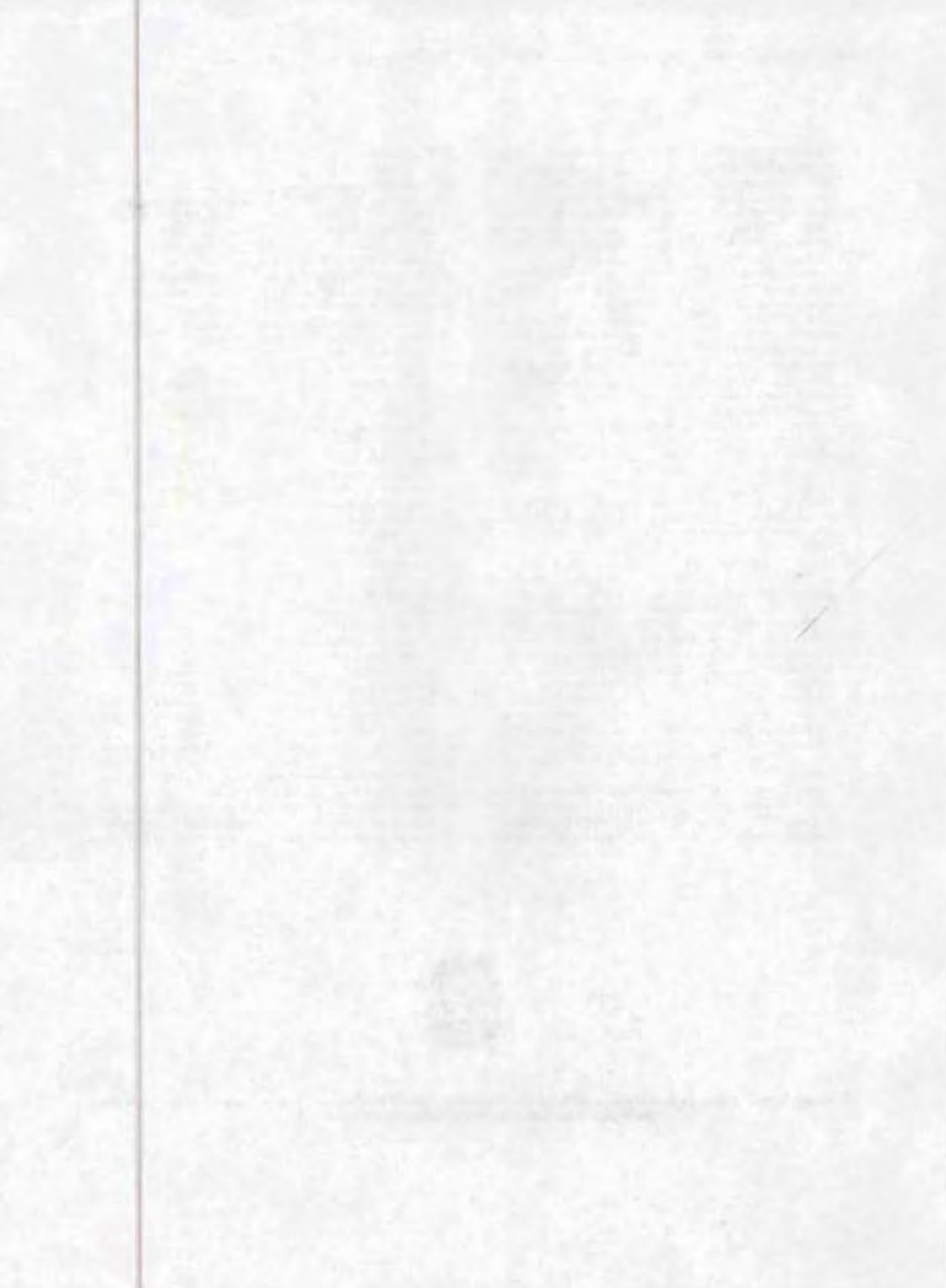
The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

- García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Medina LC 2000 α_1 -adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 389:1–12
- García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R 1999 α_1 -Adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* 30:449–458
- Graham RM, Perez DM, Hwa J, Plascik MT 1990 α_1 -Adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res* 7B:737–749
- Plascik MT, Perez DM 2001 α_1 -Adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther* 298:403–410
- Diviani D, Lattion AL, Larbi N, Kunapuli P, Pronin A, Benovic JL, Cotecchia S 1996 Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_1B -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 271:5049–5058
- Iacovelli L, Franchetti R, Grisolia D, De Biasi A 1999 Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, α_1B -adrenergic, and A(1) adenosine receptor-mediated responses. *Mol Pharmacol* 56:316–324
- Diviani D, Lattion AL, Cotecchia S 1997 Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α_1B -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 272:28712–28719
- Vázquez-Prado J, Medina LC, García-Sáinz JA 1997 Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of α_1B -adrenoceptors in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 272:27330–27337
- Medina LC, Vázquez-Prado J, Torres-Padilla ME, Mendoza-Mendoza A, Cruz Muñoz ME, García-Sáinz JA 1998 Crosstalk: phosphorylation of α_1B -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett* 422:141–145
- Casas-González P, Vázquez-Prado J, García-Sáinz JA 2000 Lysophosphatidic acid modulates α_1B -adrenoceptor phosphorylation and function: roles of G_i and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol* 57:1027–1033
- Casas-González P, Ruiz-Martínez A, García-Sáinz JA 2003 Lysophosphatidic acid induces α_1B -adrenergic receptor phosphorylation through G β - γ , phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochim Biophys Acta* 1633:75–83
- García-Sáinz JA, Romero-Ayala MT, Molina-Muñoz T, Medina LC 2004 Insulin induces α_1B -adrenergic receptor phosphorylation and desensitization. *Life Sci* 75:1937–1947
- Medina LC, Vázquez-Prado J, García-Sáinz JA 2000 Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and α_1B -adrenoceptors. *Biochem J* 350:413–419
- Adams TE, McKern NM, Ward CW 2004 Signaling by the type 1 insulin-like growth factor receptor: interplay with the epidermal growth factor receptor. *Growth Factors* 22:89–95
- Laron Z 2001 Insulin-like growth factor 1 (IGF-I): a growth hormone. *Mol Pathol* 54:311–316
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A 1993 Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73–82
- Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW 2000 Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57:1050–1093
- Enfingh-Pearsall A, Kahn CR 2004 Differential roles of the insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in response to insulin and IGF-I. *J Biol Chem* 279:38016–38024
- Dupont J, LuRoith D 2001 Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res* 55(Suppl 2):22–26
- Patel TB 2004 Single transmembrane spanning heterotrimeric G protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol Rev* 56:371–385
- Nishimoto I, Ogata E, Kojima I 1987 Pertussis toxin inhibits the action of insulin-like growth factor-I. *Biochem Biophys Res Commun* 148:403–411
- Nishimoto I, Hata Y, Ogata E, Kojima I 1987 Insulin-like growth factor II stimulates calcium influx in competent BALB/c 3T3 cells primed with epidermal growth factor. Characteristics of calcium influx and involvement of GTP-binding protein. *J Biol Chem* 262:12120–12126

23. Roudabush FL, Pierce KL, Maudsley S, Khan KD, Luttrell LM 2000 Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-I-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells. *J Biol Chem* 275:22583–22589
24. Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ 1994 Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates $G\beta\gamma$ -mediated signaling. *J Biol Chem* 269:6193–6197
25. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A 1997 Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16:7032–7044
26. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A 1996 Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379:557–560
27. Schäfer B, Gschwind A, Ullrich A 2004 Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 23:991–999
28. Cantley LC 2002 The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655–1657
29. Wymann MP, Pirola L 1998 Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436:127–150
30. Murga C, Fukuhara S, Gutkind JS 2000 A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase β in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J Biol Chem* 275:12069–12073
31. Murga C, Laguinge L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS 1998 Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for α and $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase γ . *J Biol Chem* 273:19080–19085
32. Kerchner KR, Clay RL, McCleery G, Watson N, McIntire WE, Myung CS, Garrison JC 2004 Differential sensitivity of phosphatidylinositol 3-kinase p110 γ to isoforms of G protein $\beta\gamma$ dimers. *J Biol Chem* 279:44554–44562
33. Kurosu H, Maehama T, Okada T, Yamamoto T, Hoshino S, Fukui Y, Ui M, Hazeki O, Katada T 1997 Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110 β is synergistically activated by the $\beta\gamma$ subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J Biol Chem* 272:24252–24256
34. Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Ando A, Kotani K, Kitamura T, Kitamura Y, Ueda H, Stephens L, Jackson TR, Waterfield MD, Kasuga M 1994 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7415–7419
35. Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M 1997 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7:776–789
36. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT 1998 Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279:710–714
37. Newton AC 1995 Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270:28495–28498
38. Alcántara-Hernández R, Leyva-Illades D, García-Sáinz JA 2001 Protein kinase C- $\alpha(1b)$ -adrenoceptor co-immunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate. *Eur J Pharmacol* 419:9–13
39. García-Sáinz JA, Romero-Ávila MT, Ruiz-Arriaga A, Ruiz-Puente J, Agundis C, Ortiz V, Isibasi A 1992 Characterization and detoxification of an easily prepared acellular pertussis vaccine. Antigenic role of the A protomer of pertussis toxin. *Vaccine* 10:341–344
40. Bernardo MM, Brown S, Li ZH, Fridman R, Mobashery S 2002 Design, synthesis, and characterization of potent, slow-binding inhibitors that are selective for gelatinases. *J Biol Chem* 277:11201–11207
41. Gonzalez AL, Joly E 1995 A simple procedure to increase efficiency of DEAE-dextran transfection of COS cells. *Trends Genet* 11:216–217
42. Cotecchia S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG, Kobilka BK 1988 Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7159–7163
43. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY 1985 A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
44. Berridge MJ, Dawson RM, Downes CP, Heslop JP, Irvine RF 1983 Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J* 212:473–482
45. Casas-González P, García-Sáinz JA 2006 Role of epidermal growth factor receptor transactivation in α_1B -adrenoceptor phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 542:31–36





XIII.BIBLIOGRAFIA

Adams TE, E. V., Garrett TP, Ward CW (2000). "Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor." Cell Mol Life Sci **57**: 1050-1093.

Alcántara-Hernández, R., D. Leyva-Illades, et al. (2001). "Protein kinase C-alpha (1b)-adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate." Eur J Pharmacol **419**(1): 9-13.

Alcántara-Hernández, R., Vázquez-Prado, J., et al. (2000). " Protein phosphatase-protein kinase interplay modulates alpha 1b-adrenoceptor phosphorylation: effects of okadaic acid". Br J Pharmacol. 129(4):724-30.

Alessi, D. R., M. Deak, et al. (1997). "3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase." Curr Biol **7**(10): 776-89.

Arrang, J. M. (1994). "Pharmacological properties of histamine receptor subtypes." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **40**(3): 275-81.

Avendaño-Vázquez, S. E., A. García-Caballero, et al. (2005). "Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1." Biochem J **385**(Pt 3): 677-84.

Baker, J., J. P. Liu, et al. (1993). "Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth." Cell **75**(1): 73-82.

Beaudeau, J. L., P. Giral, et al. (2004). "Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives." Clin Chem Lab Med **42**(2): 121-31.

Bernardo, M. M., S. Brown, et al. (2002). "Design, synthesis, and characterization of potent, slow-binding inhibitors that are selective for gelatinases." J Biol Chem **277**(13): 11201-7.

Berridge, M. J., R. M. Dawson, et al. (1983). "Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides." Biochem J **212**(2): 473-82.

Binaei, S., M. Christensen, et al. (2003). "Beta2-adrenergic receptor polymorphisms in children with status asthmaticus." Chest **123**(3 Suppl): 375S.

Bourne, H. R. (1990). "ADP-Ribosylating Toxins and G Proteins. Insights into Signal Transduction. Joel Moss and Martha Vaughan, Eds. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1990. xviii, 567 pp., to ASM members." Science **250**(4982): 841-842.

Bridges, T. M. and C. W. Lindsley (2008). "G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms." ACS Chem Biol **3**(9): 530-41.

Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573): 1655-7.

Casas-González, P. and J. A. García-Sáinz (2006). "Role of epidermal growth factor receptor transactivation in alpha1b-adrenoceptor phosphorylation." Eur J Pharmacol **542**(1-3): 31-6.

Casas-González, P., A. Ruiz-Martínez, et al. (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." Biochim. Biophys. Acta **1633**: 75-83.

Casas-González, P., J. Vázquez-Prado, et al. (2000). "Lysophosphatidic acid modulates alpha(1b)-adrenoceptor phosphorylation and function: roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase." Mol Pharmacol **57**(5): 1027-33.

Chalothorn, D., D. F. McCune, et al. (2002). "Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes." Mol Pharmacol **61**(5): 1008-16.

Claing, A., S. A. Laporte, et al. (2002). "Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins." Prog Neurobiol **66**(2): 61-79.

Corvera, S., K. R. Schwarz, et al. (1986). "Phorbol esters inhibit alpha 1-adrenergic effects and decrease the affinity of liver cell alpha 1-adrenergic receptors for (-)-epinephrine." J Biol Chem **261**(2): 520-6.

Cotecchia, S., A. Scheer, et al. (1998). "Molecular mechanisms involved in the activation and regulation of the alpha 1-adrenergic receptor subtypes." Farmacol **53**(4): 273-7.

Cotecchia, S., D. A. Schwinn, et al. (1988). "Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7159-63.

Cotecchia, S., L. Stanasila, et al. (2004). "Structural determinants involved in the activation and regulation of G protein-coupled receptors: lessons from the alpha1-adrenergic receptor subtypes." Biol Cell **96**(5): 327-33.

Cowlen, M. S., Toews, M.L (1988). "Evidence for alpha 1-adrenergic receptor internalization in DDT1 MF-2 cells following exposure to agonists plus protein kinase C activators." Mol Pharmacol **34**: 340-346.

Crespo, P., Cachero, T.G., Xu, N., and Gutkind, J.S (1995). "Dual effect of adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. ." J Biol Chem **270**: 25259-25265.

Dalle, S., T. Imamura, et al. (2002). "Insulin induces heterologous desensitization of G-protein-coupled receptor and insulin-like growth factor I signaling by downregulating beta-arrestin-1." Mol Cell Biol **22**(17): 6272-85.

Dalle, S. R., W; Imamura T; Vollenweider, P; Olefsky, JM (2001). "Insulin and Insulin Like Growth factor receptors utilize different G proteins signaling components." J Biol Chem **276**: 15688-15695.

Daub, H., C. Wallasch, et al. (1997). "Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor." Embo J **16**(23): 7032-44.

Daub, H., F. U. Weiss, et al. (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." Nature **379**(6565): 557-60.

DeFea, K. A., J. Zalevsky, et al. (2000). "beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2." J Cell Biol **148**(6): 1267-81.

Diviani, D., A. L. Lattion, et al. (1997). "Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1b-adrenergic receptor." J Biol Chem **272**(45): 28712-9.

Diviani, D., A. L. Lattion, et al. (1996). "Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1b-adrenergic receptor." J Biol Chem **271**(9): 5049-58.

Dupont, J. and D. LeRoith (2001). "Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction." Horm Res **55 Suppl 2**: 22-6.

El-Shewy, H. M., K. R. Johnson, et al. (2006). "Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors." J Biol Chem **281**(42): 31399-407.

Fan, G., E. Shumay, et al. (2001). "The scaffold protein gravin (cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein 250) binds the beta 2-adrenergic receptor via the receptor cytoplasmic Arg-329 to Leu-413 domain and provides a mobile scaffold during desensitization." J Biol Chem **276**(26): 24005-14.

Feig, L. A. (1994). "Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases." Curr Opin Cell Biol **6**(2): 204-11.

Fischer, O. M., S. Hart, et al. (2003). "EGFR signal transactivation in cancer cells." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1203-8.

Flower, D. (1999). "G-protein-coupled receptors for drug design." Biophys Acta **1422**: 207-234.

Fonseca, M. I., D. C. Button, et al. (1995). "Agonist regulation of alpha 1b-adrenergic receptor subcellular distribution and function." J Biol Chem **270**(15): 8902-9.

Fraser, C. M., F. Z. Chung, et al. (1988). "Site-directed mutagenesis of human beta-adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high-affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5478-82.

Freedman, N. J. and R. J. Lefkowitz (1996). "Desensitization of G protein-coupled receptors." Recent Prog Horm Res **51**: 319-51; discussion 352-3.

Fukunaga, S., S. Setoguchi, et al. (2006). "Monitoring ligand-mediated internalization of G protein-coupled receptor as a novel pharmacological approach." Life Sci **80**(1): 17-23.

García-Sainz, J. (2002). Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. México.

García-Sáinz, J. A., A. García-Caballero, et al. (1996). "Characterization of the alpha 1-adrenoceptors of cat liver. Predominance of the alpha 1A-adrenergic subtype." Life Sci **59**(3): 235-42.

García-Sáinz, J. A., A. Gottfried-Blackmore, et al. (1999). "Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human alpha(1b)-adrenoceptors." Eur J Pharmacol **385**(2-3): 263-71.

García-Sáinz, J. A., M. T. Romero-Ávila, et al. (2004). "Insulin induces alpha1b-adrenergic receptor phosphorylation and desensitization." Life Sci **75**(16): 1937-47.

García-Sáinz, J. A., M. T. Romero-Ávila, et al. (1992). "Characterization and detoxification of an easily prepared acellular pertussis vaccine. Antigenic role of the A protomer of pertussis toxin." Vaccine **10**(5): 341-4.

García-Sáinz, J. A., M. T. Romero-Ávila, et al. (1995). "Alpha 1-adrenoceptor subtype selectivity of tamsulosin: studies using livers from different species." Eur J Pharmacol **289**(1): 1-7.

García-Sáinz, J. A., J. Vázquez-Prado, et al. (2000). "Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation." Eur J Pharmacol **389**(1): 1-12.

García-Sáinz, J. A., J. Vázquez-Prado, et al. (1999). "Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease." Arch Med Res **30**(6): 449-58.

García-Sáinz, J. R.-Á., MT; Molina-Muñoz, T and García-Pasquel, MJ. (2008). "G Protein-Coupled Receptor-Receptor TyrosineKinase Receptor Crosstalk Regulation of Receptor Sensitivity and Roles of Autocrine Feedback Loops andSignal Integration " Current Signal Transduction Therapy **3**: 174-182.

García-Sáinz, J. A. (2002). "Adrenaline junkies-Addicted to the rush?" The Biochemist **24**: 19-21.

García-Sáinz, J. A., J. Vázquez-Prado, et al. (1999). "Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease." Arch Med Res **30**(6): 449-58.

Gavi, S., E. Shumay, et al. (2006). "G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation." Trends Endocrinol Metab **17**(2): 48-54.

Gavi, S., D. Yin, et al. (2007). "Insulin-Like Growth Factor-I Provokes Functional Antagonism and Internalization of β 1-Adrenergic Receptors." Endocrinology **148**(6): 2653-62.

Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.

Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annu Rev Biochem **56**: 615-49.

Girnita, L., S. K. Shenoy, et al. (2005). " β -Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase." J Biol Chem **280**(26): 24412-9.

Gonzalez, A. L. and E. Joly (1995). "A simple procedure to increase efficiency of DEAE-dextran transfection of COS cells." Trends Genet **11**(6): 216-7.

Graham, R. M., D. M. Perez, et al. (1996). "alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling." Circ Res **78**(5): 737-49.

Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-50.

Hadcock, J. R., J. D. Port, et al. (1992). "Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of beta 2-adrenergic receptors in response to insulin." J Biol Chem **267**(36): 26017-22.

Hait, N. C., C. A. Oskeritzian, et al. (2006). "Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases." Biochim Biophys Acta **1758**(12): 2016-26.

Hara, K., K. Yonezawa, et al. (1994). "1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7415-9.

Hernandez-Sanchez, C., V. Blakesley, et al. (1995). "The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor-I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis." J Biol Chem **270**(49): 29176-81.

Higashiyama, S. (2004). "Metalloproteinase-mediated shedding of heparin-binding EGF-like growth factor and its pathophysiological roles." Protein Pept Lett **11**(5): 443-50.

Hobson, J. P., H. M. Rosenfeldt, et al. (2001). "Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility." Science **291**(5509): 1800-3.

Holstein, D. M., K. A. Berg, et al. (2004). "Calcium-sensing receptor-mediated ERK1/2 activation requires Galphai2 coupling and dynamin-independent receptor internalization." J Biol Chem **279**(11): 10060-9.

Karoor, V. and C. C. Malbon (1996). "Insulin-like growth factor receptor-1 stimulates phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor in vivo on sites distinct from those phosphorylated in response to insulin." J Biol Chem **271**(46): 29347-52.

Kerchner, K. R., R. L. Clay, et al. (2004). "Differential sensitivity of phosphatidylinositol 3-kinase p110gamma to isoforms of G protein betagamma dimers." J Biol Chem **279**(43): 44554-62.

Kleuss, C., H. Scherubl, et al. (1993). "Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G proteins." Science **259**(5096): 832-4.

Koch, W. J., B. E. Hawes, et al. (1994). "Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling." J Biol Chem **269**(8): 6193-7.

Kolakowski, L. F., Jr. (1994). "GCRDb: a G-protein-coupled receptor database." Receptors Channels **2**(1): 1-7.

Kreienkamp, H. J. (2002). "Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins." Curr Opin Pharmacol **2**(5): 581-6.

Kuemmerle, J. F. and K. S. Murthy (2001). "Coupling of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase to Gi2 in human intestinal smooth muscle: Gbetagamma - dependent mitogen-activated protein kinase activation and growth." J Biol Chem **276**(10): 7187-94.

Kurosu H, M. T., Okada T, Yamamoto T, Hoshino S, Fukui Y, Ui M, Hazeki O, Katada T. (1997). "Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is

synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. ." J Biol Chem **272**: 24252-24256.

Lacovelli, L., R. Franchetti, et al. (1999). "Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, alpha(1b)-adrenergic, and A(1) adenosine receptor-mediated responses." Mol Pharmacol **56**(2): 316-24.

Laron, Z. (2001). "Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone." Mol Pathol **54**(5): 311-6.

Lattion, A. L., D. Diviani, et al. (1994). "Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1b-adrenergic receptor." J Biol Chem **269**(36): 22887-93.

Leclercq, T. M. and S. M. Pitson (2006). "Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate." IUBMB Life **58**(8): 467-72.

Leeb-Lundberg, L. M., S. Cotecchia, et al. (1985). "Phorbol esters promote alpha 1-adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5651-5.

Lefkowitz, R. J. (1998). "G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization." J Biol Chem **273**(30): 18677-80.

Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, et al. (1999). "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes." Science **283**(5402): 655-61.

Luttrell, L. M. and R. J. Lefkowitz (2002). "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." J Cell Sci **115**(Pt 3): 455-65.

Ma, Y., S. Pitson, et al. (2005). "Sphingosine activates protein kinase A type II by a novel cAMP-independent mechanism." J Biol Chem **280**(28): 26011-7.

McCune, D. F., S. E. Edelman, et al. (2000). "Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1b)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists." Mol Pharmacol **57**(4): 659-66.

Medina, L. C., J. Vázquez-Prado, et al. (2000). "Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and alpha1b-adrenoceptors." Biochem J **350 Pt 2**: 413-9.

Medina, L. C., J. Vázquez-Prado, et al. (1998). "Crosstalk: phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors." FEBS Lett **422(2)**: 141-5.

Miles D. Thompson, D. E. C. C. a. P. A. J. (2008). Methods in Molecular Biology. Pharmacogenomics in Drug Discovery and Development

Moore, C. A., S. K. Milano, et al. (2007). "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 451-82.

Morris, D. P., R. R. Price, et al. (2004). "Cellular trafficking of human alpha1a-adrenergic receptors is continuous and primarily agonist-independent." Mol Pharmacol **66(4)**: 843-54.

Murayama, T., S. C. Tsai, et al. (1993). "Effects of temperature on ADP-ribosylation factor stimulation of cholera toxin activity." Biochemistry **32(2)**: 561-6.

Murga, C., S. Fukuhara, et al. (2000). "A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt." J Biol Chem **275(16)**: 12069-73.

Murga, C., L. Laguinge, et al. (1998). "Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma." J Biol Chem **273(30)**: 19080-5.

Neer, E. J. (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." Cell **80(2)**: 249-57.

Neer, E. J. and D. E. Clapham (1988). "Roles of G protein subunits in transmembrane signalling." Nature **333(6169)**: 129-34.

Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C: structure, function, and regulation." J Biol Chem **270(48)**: 28495-8.

Nishi, E. and M. (2004). "Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is a mediator of multiple physiological and pathological pathways." Growth Factors **22(4)**: 253-60.

Nishimoto, I., Y. Hata, et al. (1987). "Insulin-like growth factor II stimulates calcium influx in competent BALB/c 3T3 cells primed with epidermal growth factor. Characteristics of calcium influx and involvement of GTP-binding protein." J Biol Chem **262**(25): 12120-6.

Nishimoto, I., E. Ogata, et al. (1987). "Pertussis toxin inhibits the action of insulin-like growth factor-I." Biochem Biophys Res Commun **148**(1): 403-11.

Olivares-Reyes, J. A., B. H. Shah, et al. (2005). "Agonist-induced interactions between angiotensin AT1 and epidermal growth factor receptors." Mol Pharmacol **68**(2): 356-64.

Patel, T. B. (2004). "Single transmembrane spanning heterotrimeric g protein-coupled receptors and their signaling cascades." Pharmacol Rev **56**(3): 371-85.

Pediani, J. D., J. F. Colston, et al. (2005). "Beta-arrestin-dependent spontaneous alpha1a-adrenoceptor endocytosis causes intracellular transportation of alpha-blockers via recycling compartments." Mol Pharmacol **67**(4): 992-1004.

Penn, R. B., A. N. Pronin, et al. (2000). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases." Trends Cardiovasc Med **10**(2): 81-9.

Perry, S. J. and R. J. Lefkowitz (2002). "Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation." Trends Cell Biol **12**(3): 130-8.

Piasecik, M. T. and D. M. Perez (2001). "Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions." J Pharmacol Exp Ther **298**(2): 403-10.

Pierce, K. L., L. M. Luttrell, et al. (2001). "New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades." Oncogene **20**(13): 1532-9.

Pitcher, J. A., R. A. Hall, et al. (1998). "The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin." J Biol Chem **273**(20): 12316-24.

Premont, R. T. and R. R. Gainetdinov (2007). "Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 511-34.

Rapacciuolo, A., S. Suvarna, et al. (2003). "Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways." J Biol Chem **278**(37): 35403-11.

Rodriguez, C. E., Calvo, E., et al. (2009). "Receptor tyrosine kinase regulate α_{1D} -adrenoceptor signaling properties: Phosphorylation and Desensitization". The Int J of Biochem & Cell Biol **41**, 1276-83

Romero-Ávila, M. T., C. F. Flores-Jasso, et al. (2002). "alpha1b-Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor-beta." Biochem J **368**(Pt 2): 581-7.

Roudabush, F. L., K. L. Pierce, et al. (2000). "Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells." J Biol Chem **275**(29): 22583-9.

Salmon, W. D., Jr. and W. H. Daughaday (1957). "A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro." J Lab Clin Med **49**(6): 825-36.

Schafer, B., A. Gschwind, et al. (2004). "Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion." Oncogene **23**(4): 991-9.

Schmedtje, J. F., Jr., G. W. Evans, et al. (2003). "Treatment of chronic heart failure in a managed care setting. Baseline results from the Achieving Cardiac Excellence Project." N C Med J **64**(1): 4-10.

Scott, M. G., A. Benmerah, et al. (2002). "Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells." J Biol Chem **277**(5): 3552-9.

Seifert, R. and K. Wenzel-Seifert (2002). "Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **366**(5): 381-416.

Smith, F. D. and J. D. Scott (2002). "Signaling complexes: junctions on the intracellular information super highway." Curr Biol **12**(1): R32-40

Spiegel, S. and S. Milstien (2007). "Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives." J Biol Chem **282**(4): 2125-9.

Stephens, L., K. Anderson, et al. (1998). "Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B." Science **279**(5351): 710-4.

Sukocheva, O., C. Wadham, et al. (2006). "Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1." J Cell Biol **173**(2): 301-10.

Torres-Marquez, M. E., M. T. Romero-Avila, et al. (1992). "Characterization of rat white fat cell alpha 1b-adrenoceptors." Mol Pharmacol **42**(3): 403-6.

Usui, I., T. Imamura, et al. (2004). "beta-arrestin-1 competitively inhibits insulin-induced ubiquitination and degradation of insulin receptor substrate 1." Mol Cell Biol **24**(20): 8929-37.

Vázquez-Prado, J., P. Casas-González, et al. (2003). "G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions." Cell Signal **15**(6): 549-57.

Vázquez-Prado, J. and J. A. García-Sáinz (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.

Vázquez-Prado, J., L. C. Medina, et al. (1997). "Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts." J Biol Chem **272**(43): 27330-7.

Vázquez-Prado, J., L. C. Medina, et al. (2000). "Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects." J Biol Chem **275**(9): 6553-9.

Wang, S. Y., Y. Song, et al. (2007). "Internalization and distribution of three alpha1-adrenoceptor subtypes in HEK293A cells before and after agonist stimulation." Acta Pharmacol Sin **28**(3): 359-66.

Wyman, M. P. and L. Pirola (1998). "Structure and function of phosphoinositide 3-kinases." Biochim Biophys Acta **1436**(1-2): 127-50.

Yamane, H. K. and B. K. Fung (1993). "Covalent modifications of G-proteins." Annu Rev Pharmacol Toxicol **33**: 201-41.

Yamauchi, J., M. Nagao, et al. (1997). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits." J Biol Chem **272**(44): 27771-7.

Zhong, H. and K. P. Minneman (1999). "Alpha1-adrenoceptor subtypes." Eur J Pharmacol **375**(1-3): 261-76.