

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química y Biología Molecular II



**ESTUDIO DEL DOMINIO CARBOXI-TERMINAL DEL
RECEPTOR DE GLP-1(7-36)AMIDA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Patricia Vázquez Pérez

Bajo la dirección de las Doctoras:

Elvira Álvarez García
Isabel Roncero Rincón

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2046-3

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



**ESTUDIO DEL DOMINIO CARBOXI-TERMINAL
DEL RECEPTOR DE GLP-1(7-36)AMIDA**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA VÁZQUEZ PÉREZ

MADRID, 2002

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**ESTUDIO DEL DOMINIO CARBOXI-TERMINAL
DEL RECEPTOR DE GLP-1(7-36)AMIDA**

Trabajo realizado para optar al grado de Doctora en Farmacia presentada por:

PATRICIA VÁZQUEZ PÉREZ

Realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Directoras:

Dra. Elvira Álvarez García

Dra. M^a Isabel Roncero Rincón

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis habría sido imposible sin el apoyo de todas las personas que han estado a mi alrededor durante este periodo de tiempo.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Enrique Blázquez Fernández, el haberme permitido trabajar en su grupo, pudiendo iniciarme en la investigación, así como por la confianza que ha mostrado siempre en mí.

Quiero agradecer de manera muy especial a las directoras de esta tesis, las doctoras Elvira Álvarez García y M^a Isabel Roncero Rincón por la dedicación y el interés mostrado en la dirección de esta tesis doctoral, por animarme y por el cariño mostrado durante la realización de este trabajo.

Además a los doctores Jose Antonio Zueco, Esther Velázquez, Juan Miguel Ruiz Albusac y Angel Santos por sus consejos y apoyo durante el paso por este laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio, que juntos hemos compartido momentos inolvidables, a Patty, Agus, David, Pili, Fernando, Vanessa, Tere y Bienve por hacer de esas comidas momentos muy "completos" y "estupendos" y por hacerme tan agradable el trabajo. En especial a Mar , aunque con su "maremoto" particular siempre ha sacado tiempo para escuchar y dar consejos "fluyendo pero controlando". Gracias por esa sensibilidad especial y esa sonrisa siempre agradecida.

Una de las satisfacciones de haber trabajado en este laboratorio ha sido el poder conocer a personas como Marta, por su acogida en los primeros momentos, la felicidad que transmitía en el laboratorio, y por esa "hora fantástica" en la que todo se volvía del revés, por ser como es; y como Carmen, por su ayuda y apoyo incondicional, por transmitir tanto sin decir palabras, por los momentos tan intensos compartidos en este último año y por esa "historia de una tesis" que siempre recordaré.

Quiero agradecer a M^a Angeles el haberme aportado tanto en tan poco tiempo, y por sus ánimos en todo momento. A Antonio, por su ayuda a nivel profesional y personal, por estar siempre dispuesto a escuchar.

También me gustaría agradecer a mis "boticarios" Maite, Alfredo, Ricardo, Carlos y Juanjo, el interés mostrado por mi trabajo en todo este tiempo, por vuestro apoyo y confianza que habeis depositado en mí.

Por supuesto a los amigos de siempre que te ayudan a desconectar de este "mundillo", volviendo a recordar situaciones irrepetibles a Mingo, Pablo, Alejandro,

Laura y a Isa por estar en todos los momentos importantes, desde siempre. A Conchi por enseñarme a valorar otras cosas, y por su amistad.

A Miguel, por haberme apoyado en todas las decisiones que he tomado, por haber compartido tan buenos momentos, por el tiempo que también ha dedicado a esta tesis con tanto interés, y por ser especial.

Pero de manera muy especial me gustaría dedicar este trabajo a mi familia, a mis hermanos Ana y Andrés por la ilusión que ponen con todo lo que hago, por el "aguante" en muchos momentos y por saber estar siempre ahí, y muy especial a mis padres, gracias por haber sacrificado tantas cosas por nosotros, por el apoyo y el entusiasmo demostrado siempre en todo lo que he hecho y porque sin sus "enseñanzas" yo no sería como soy, GRACIAS.

AKAP:	Proteína de anclaje de la quinasa A.	FBS:	Suero bovino fetal.
AMPC:	3´5´Adenosin monofosfato cíclico.	GDP:	Guanosin difosfato.
AP:	Proteínas adaptadoras.	GHRP:	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento.
ARNm:	Acido ribonucleico mensajero.	GIP:	Polipeptido inhibidor gástrico.
ATP:	Adenosin trifosfato.	GLP-1:	Péptido semejante al glucagón de tipo 1.
Bmax:	Capacidad de unión (número de receptores).	GLP-2:	Péptido semejante al glucagón de tipo 2.
BSA:	Albúmina de suero bovino.	GLPR-1:	Receptor de GLP-1 sin modificar o control.
CaMK:	Calcio calmodulina quinasa.	GLUT-2:	Transportador de glucosa tipo 2.
CCK:	Colecistoquinina.	GPCR:	Receptor acoplado a proteínas G.
cDNA:	Acido desoxirribonucleico complementario.	GRK:	Quinasa específica de receptores acoplados a proteínas G.
CHO:	Línea celular de fibroblastos de ovario de hamster chino.	GRP:	Proteína fosfatasa específicas de receptores acoplados a proteínas G.
COS-7:	Línea celular derivada de riñón de mono.	GRPP:	Polipéptido pancreático relacionado con la glicentina.
DAG:	Diacilglicerol.	GST:	Glutación-S-Transferasa.
DEAE:	Dietil aminoetilo.	GTP:	Guanosin trifosfato.
DMEM:	Dulbecco modificado Eagle médium.	HBS:	Tampón HEPES salino.
DMSO:	Dimetil sulfóxido.	hCG/LH:	Hormona luteinizante gonadotropina coriónica.
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato.	HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución.
DPP-IV:	Dipeptidil peptidasa IV.	HT-5:	5-Hidroxi-triptamina.
DSS:	Disuccinimidil suberato.	IBMX:	Isobutil-metil-xantina.
DTT:	Ditiotreitol.		
EC:	Dominio extracelular.		
ECL:	Reactivo de inmunodetección por quimioluminiscencia.		
ERK:	Quinasa de regulación extracelular.		

IC:	Dominio intracelular.	PKA:	Proteína quinasa dependiente de AMPc.
IN/SUP:	Cociente internalización/superficie.	PKC:	Proteína quinasa dependiente de calcio.
INS-1:	Línea celular de insulinoma de rata.	PLC:	Fosfolipasa C.
IP-1/2:	Péptido intermedio.	PMA:	Forbol-12 miristato-13-acetato.
IP₃:	Inositol 1,4,5-trifosfato	PMSF:	Fluoruro de metilfenil sulfonio.
IP₄:	Inositol 1,3,4,5-trifosfato	PPi:	Ión pirofosfato.
IPTG:	Isopropil-β-D-tiogalactosido.	PTH:	Hormona paratiroidea.
JNK:	Quinasa que fosforilada c-jun.	RGS:	Proteína reguladora de la señalización.
Kd:	Constante de disociación.	RIN:	Línea celular de insulinoma de rata.
KRH:	Krebs Ringer HEPES.	SDS:	Dodecilsulfato sódico.
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógenos.	SNC:	Sistema nervioso central.
MEK:	Proteínas quinasas de las proteínas quinasas activadas por mitógenos.	TBS:	Tampón Tris salino.
MPGF:	Fragmento mayor del proglucagón.	TCA:	Acido tricloro acético.
PACAP:	Péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria.	TFA:	Acido trifluoro acético.
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida.	TRH:	Hormona liberadora de tirotropina.
PBS:	Tampón fosfato salino.	TSH:	Hormona estimulante del tiroides.
PC:	Enzimas proconvertasas.	VIP:	Polipéptido vasoactivo intestinal.
PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa.	β₂AR:	Receptor β ₂ adrenérgico.
PDE:	Fosfodiesterasa de AMPc.		
PIP₂:	Fosfatidil inositol 4-5 bisfosfato.		

ÍNDICE

Introducción

1.- GLUCAGÓN Y PÉPTIDOS RELACIONADOS	2
1.1.- Procesamiento postraduccional del preproglucagón	2
1.2.- Efectos biológicos del GLP-1	5
1.2.1.- Receptor de GLP-1	5
1.2.2.- Acciones fisiológicas del GLP-1	7
2.- MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LA FAMILIA DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR).....	11
2.1.- Características de los receptores acoplados a proteínas G.	11
2.2.- Proteínas G.....	11
2.3.-Cascadas enzimáticas implicadas en la formación de segundos mensajeros.....	13
2.3.1.- Señalización vía de la adenilato ciclasa	13
2.3.2.- Señalización por la cascada del fosfoinosítido.....	15
2.4.- Señalización a través de la vía de las MAPKs	16
3.- REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G.....	19
3.1.- Desacoplamiento de los receptores de proteínas G	19
3.1.1.- Desensibilización heteróloga.....	20
3.1.2.- Desensibilización homóloga.	20
3.1.2.1.- <i>Las GRKs están reguladas por quinasas dependientes de segundos mensajeros (PKC y PKA)..</i>	22
3.2.1.- Mecanismo de Endocitosis.....	23
3.2.2.- Proceso de resensibilización.....	25
4.- MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1.....	26
5.- MODIFICACIÓN POSTRANSDUCIONAL. PALMITOILACIÓN	28
5.1.- Implicación de la palmitoilación en la regulación de efectores y producción de segundos mensajeros.	29
5.2.- Papel de la palmitoilación en la endocitosis.....	30

Objetivos

OBJETIVOS.....	32
-----------------------	-----------

Materiales y Métodos

1.-CONSTRUCCIÓN DE LOS DIFERENTES MUTANTES DEL RECEPTOR DE GLP-1	34
1.1.- Materiales utilizados	34

1.2.- Mutagénesis	34
1.2.1.- Mutagénesis dirigida	35
1.2.2.- Obtención de mutantes mediante PCR.....	39
2.-TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON LOS DIFERENTES MUTANTES DEL RECEPTOR.....	42
2.1 Materiales utilizados en los cultivos celulares.....	42
2.2.-Obtención de líneas celulares estables que expresan receptores de GLP-1 control y mutantes.	43
2.3.-Obtención de líneas celulares con expresión transitoria de receptores GLP-1 control y mutantes.	43
3.- CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES	44
3.1.- Materiales utilizados	44
3.2.-Marcaje de GLP-1(7-36) amida con [¹²⁵ I].....	45
3.3.-Análisis del [¹²⁵ I]-GLP-1(7-36)amida unido a los receptores de GLP-1 en la superficie celular de células CHO transfectadas e identificación de los complejos ligando -receptor	45
3.3.1.- Ensayos de Unión.....	45
3.3.2.-Identificación de los complejos [¹²⁵ I]-GLP-1(7-36)amida-receptor "cross-linking"	46
4.- TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.	47
4.1.- Materiales utilizados	47
4.2.-Actividad de la Adenilato ciclasa.....	47
4.3.- Detección mediante inmunotransferencia de las formas fosforiladas de las quinasas reguladas extracelularmente (ERK1/ERK2).....	48
5.- ENDOCITOSIS Y REDISTRIBUCIÓN	49
5.1.-Medida de la internación del receptor de GLP-1.....	49
5.2.-Efecto del GLP-1(7-36)amida sobre el número de receptores de GLP-1 en la superficie celular. Ensayos de redistribución.....	51
6.- FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR.....	52
6.1 Materiales utilizados.....	52
6.2.-Fosforilación "in vivo". Inmunoprecipitación	52
6.3.- Fosforilación del extremo C-terminal del receptor de GLP-1 por la proteína quinasa C	53
6.3.1.- Obtención de las proteínas de fusión.....	53
6.3.2.-Ensayo de fosforilacion por proteína quinasa C (PKC)	54
7.- PALMITOILACIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1	55
7.1.- Materiales utilizados para el marcaje	55
7.2.- Procedimiento para el ensayo de palmitoilación.....	55

Resultados

1.- CARACTERIZACION DE RECEPTORES DE GLP-1 CONTROL (GLPR-1)	57
1.1.- Curvas de Asociación de [¹²⁵ I]-GLP-1(7-36)amida a sus receptores en función del tiempo y temperatura	57
1.2.-Interacciones ligando-receptor	58
1.2.1.-Curvas de desplazamiento de [¹²⁵ I]-GLP-1(7-36)amida a su receptor e identificación de los complejos ligando-receptor	58
1.3.- Análisis de la transducción de señales generadas desde el receptor de GLP-1	60
1.3.1.- Estudio de la activación del sistema de la adenilato ciclasa. Medida de la producción de AMPc ..	61
1.3.2.- Efecto de la estimulación con el agonista sobre la activación de la vía de las MAPKs	62
1.4.- Cinética de endocitosis y redistribución del receptor de GLP-1	63
1.4.1.- Endocitosis del receptor de GLP-1	63
1.4.2.- Ensayos de redistribución.....	65
2.- CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE GLP-1 CON DELECCIONES EN SU EXTREMO CARBOXILO TERMINAL, ASI COMO MUTACIONES PUNTUALES EN LOS AMINOÁCIDOS 408-410	66
2.1.- Efecto de las mutaciones en la interacción ligando-receptor.....	67
2.1.1.- Ensayos de desplazamiento de [¹²⁵ I]-GLP-1(7-36)amida.....	67
2.1.2.- Identificación de los complejos ligando-receptor.....	68
2.2.- Comparación de los mecanismos de transducción de señales en los receptores mutados y el control... 69	
2.2.1.- Producción de AMPc	69
2.2.2.- Estimulación de la vía de señalización de las MAP quinasas	71
2.3.- Cinética de endocitosis y redistribución.....	72
2.3.1.- Experimentos de internación	72
2.3.2.- Estudio del mecanismo de endocitosis del receptor de GLP-1.....	76
2.3.3.- Ensayos de redistribución.....	77
3.- CARACTERIZACION DE RECEPTORES DE GLP-1 TRAS LA SUSTITUCION DE LA CISTEINA EN POSICION 438 POR ALANINA	79
3.1.- Marcaje de las células con [³⁵ S]-metionina y [³ H]-palmítico	80
3.2.- Efecto de las mutaciones en la interacción ligando-receptor.....	80
3.2.1.- Ensayos de desplazamiento de [¹²⁵ I]-GLP-1(7-36)amida.....	80
3.2.2.- Identificación de los complejos ligando-receptor.....	82
3.3.- Comparación de los mecanismos de transducción de señales entre los receptores mutados y control . 83	
3.3.1.- Producción de AMPc	83
3.3.2.- Estimulación de la vía de señalización de las MAP quinasas	85
3.4.-Cinética de endocitosis y redistribución.....	86
3.4.1.- Efecto de la sustitución de la cisteína 438 por alanina en la internación de los receptores	86
3.4.2.- Estudio del mecanismo de endocitosis de los receptores mutados.....	88
3.4.3.- Ensayos de redistribución.....	89
3.4.4.-Efecto del inhibidor específico de la PKC sobre la endocitosis	90

4.- ESTUDIOS DE FOSFORILACION	91
4.1. Estudios de fosforilación " <i>in vivo</i> "	91
4.2.- Estudios de fosforilación " <i>in vitro</i> "	91

Discusión

1.- SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1 CONTROL.....	94
2.- EFECTO DE LAS DELECCIONES REALIZADAS EN EL EXTREMO CARBOXILO- TERMINAL DEL RECEPTOR DE GLP-1 EN SU SEÑALIZACIÓN.....	96
3.- EFECTO DE LA MODIFICACIÓN DEL POSIBLE SITIO DE PALMITOILACIÓN EN LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1	101
4.- ESTUDIOS DE FOSFORILACIÓN	105

Conclusiones

CONCLUSIONES.....	108
--------------------------	------------

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA.....	111
--------------------------	------------

INTRODUCCIÓN



1.- GLUCAGÓN Y PÉPTIDOS RELACIONADOS

El péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1: “Glucagon-like peptide-1”) es uno de los productos codificados por el gen del proglucagón cuya modificación postraduccional origina las formas truncadas y amidadas activas del GLP-1: GLP-1(7-37) y GLP-1(7-36)amida, así como el GLP-1(1-36)amida que carece de acción biológica. Tanto el GLP-1(7-37) y el GLP-1(7-36)amida se consideran moléculas con actividad incretina en el eje enteroinsular. Se denominan incretinas aquellas moléculas que se secretan tras la ingesta desde células gastrointestinales y estimulan la secreción de insulina, en respuesta a un aumento en la concentración de glucosa en sangre (Heller y Aponte, 1995). Otras hormonas que se engloban dentro de este tipo de moléculas, son el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y la colecistoquinina (CCK).

1.1.- Procesamiento postraduccional del proglucagón

El GLP-1 es un péptido compuesto de 37 aminoácidos que proviene, al igual que otras hormonas peptídicas, de un precursor de mayor masa molecular: el proglucagón (Bell, y cols., 1983).

El gen humano del proglucagón, constituido por 10 Kb, se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 (Fehmann, y cols., 1995) y está compuesto de 6 exones y 5 intrones. El ARNm que codifica para el proglucagón es idéntico en páncreas, intestino, y cerebro pero su procesamiento es característico en cada uno de estos órganos. El proglucagón, tiene una masa molecular de 19,8 kDa, y consta de 180 aminoácidos, de los cuales los 20 primeros constituyen el péptido señal, y los otros 160 aminoácidos constituyen la molécula de proglucagón. Esta molécula resultante tras la eliminación del péptido señal, consta de cuatro dominios funcionales: a) polipéptido pancreático relacionado con la glicentina (GRPP), b) glucagón, c) GLP-1 y d) péptido semejante al glucagón de tipo 2 (GLP-2). El procesamiento proteolítico del proglucagón es dependiente de tejido y da lugar a la expresión de diferentes péptidos de manera específica, como se indica en el esquema de la figura 1.

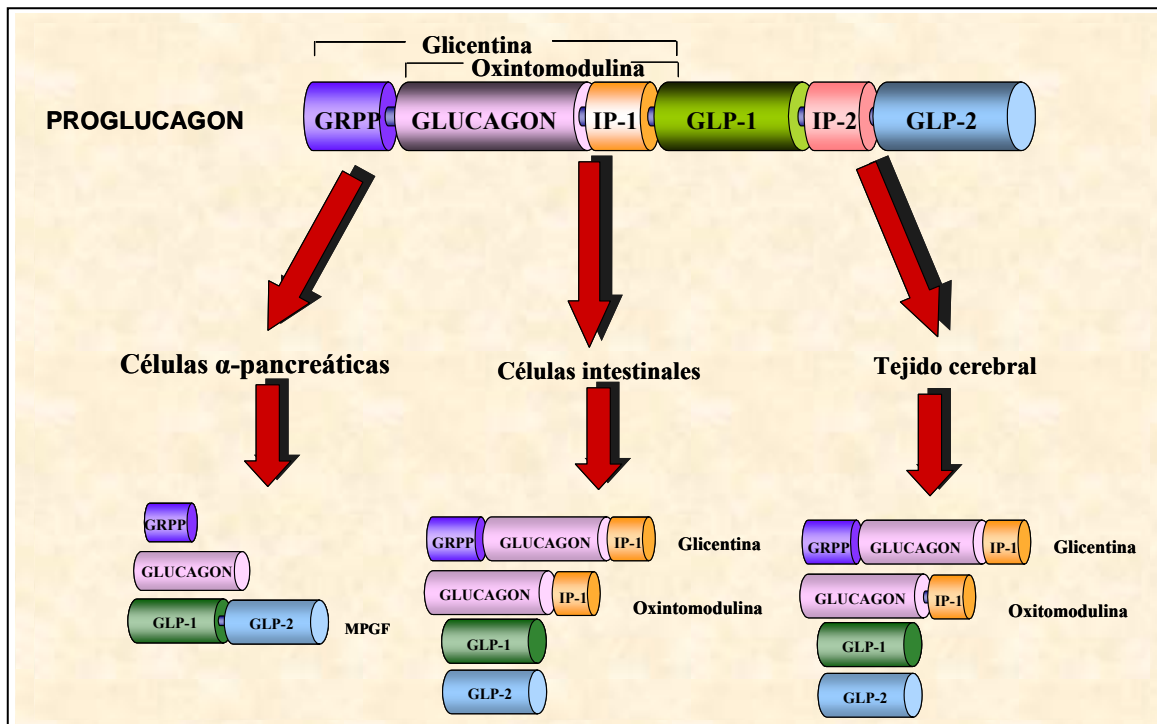


Figura 1.- Esquema representativo del procesamiento posttraduccional del proglucagón con la expresión de péptidos característica de cada tejido.

En *páncreas*, el procesamiento posttraduccional del proglucagón, ocurre en las células α de los islotes de Langerhans, dando lugar a los siguientes péptidos: polipéptido pancreático relacionado con la glicentina (GRPP), (que comprende los residuos 1-30), glucagón (residuos 33-61), y un péptido llamado fragmento mayor del proglucagón (MPGF) (residuos del 72-158), y que engloba las secuencias del GLP-1 y del GLP-2 (Perfetti y Merkel, 2000).

En el *intestino*, el procesamiento tiene lugar en las células L del ileon, colon y recto, produciéndose glicentina (residuos 1-69), oxintomodulina (residuos 33-69), GLP-1 (residuos del 72-108) y GLP-2 (residuos 126-158) (Wettergren, y cols., 1993). En este tejido la liberación de los péptidos GLP-1 y GLP-2 se produce en las células enteroendocrinas de la mucosa intestinal.

En el *cerebro* el procesamiento del proglucagón tiene lugar mayoritariamente en el tronco cerebral, así como en el hipotálamo y es similar al observado en las células L intestinales (Drucker, y Asa, 1988).

El GLP-1 puede ser modificado por la acción de unas enzimas llamadas proconvertasas como la PC1 y PC2, que provocan una rotura proteolítica y/o una amidación en dicho péptido. La rotura proteolítica elimina los seis primeros aminoácidos, originando así, la forma GLP-1 (7-37). El proceso de amidación ocurre en el extremo C-terminal de la molécula dando lugar a GLP-1(1-36)amida o GLP-1(7-36)amida, según sea el péptido de partida. De todas estas formas moleculares, las formas truncadas son las que tienen actividad biológica.

La secreción de estos péptidos a la circulación sanguínea es estimulada por una sobrecarga de oral de glucosa, lo cual facilita la liberación de insulina.

En general los GLPs, tienen "*in vivo*" una vida media muy corta, ya que son degradados por la acción de un enzima que se encuentra en el plasma sanguíneo, la dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV) (Mentlein, y cols., 1993). Esta enzima actúa hidrolizando el GLP-1 en el extremo amino terminal dando lugar a la forma GLP-1(9-36)amida, que es también capaz de unirse al receptor de GLP-1 aunque con menor afinidad, pudiéndose considerar como un antagonista competitivo del receptor "*in vivo*" (Drucker, 1998). Una vez degradados estos péptidos son eliminados rápidamente de la circulación sanguínea, principalmente por el riñón (Ruiz-Grande, y cols., 1990).

La exendina-4 es un análogo del GLP-1(7-36)amida. Es un péptido compuesto por 39 aminoácidos que ha sido purificado a partir del veneno del reptil *Heloderma suspectum* (comúnmente conocido como "monstruo de Gila") (Eng, y cols., 1992) y que tiene un 53% de homología con el GLP-1(7-36) amida. Así, ambos son capaces de interactuar con el mismo receptor, en células de insulinoma, membranas de pulmón e islotes pancreáticos (Göke, y cols., 1993) y aumentan la producción de AMPc en dichos sistemas. La acción de la exendina-4 en el cerebro de rata es similar a la del GLP-1, provocando un aumento de la presión arterial y del ritmo cardiaco, pero su efecto es más prolongado (Barragán, y cols., 1994).

Por el contrario la exendina (9-39) amida, forma truncada en el extremo amino terminal de la exendina, es un potente antagonista del receptor de GLP-1 en las células β pancreáticas, ya que en ratas reduce los niveles de insulina postpandriales, disminuyendo la respuesta secretora de insulina y por tanto aumentando la concentración de glucosa en sangre. En el sistema cardiovascular, hígado y cerebro la exendina (9-39) amida, también bloquea los efectos del GLP-1, y es capaz de funcionar como un antagonista del receptor en cerebro. (Barragán, y cols., 1996; Alcántara, y cols., 1997). La exendina (9-39)amida que es un antagonista del receptor de GLP-1 pancreático, actúa como agonista en otros

tejidos como adipocitos de rata (Redondo, y cols., 2002) y en miocitos humanos y de rata (González, y cols., 2002).

1.2.- Efectos biológicos del GLP-1

1.2.1.- Receptor de GLP-1

El GLP-1 induce sus efectos biológicos a través de la unión a un receptor específico, el receptor de GLP-1, localizado en la membrana celular de las células diana a su acción. Este receptor fue descubierto por primera vez en células RINm5F (Göke, y Conlon, 1988), y está constituido por una glicoproteína de una masa molecular de 66 kDa con 463 aminoácidos (Thorens, 1992). En cerebro y corazón la secuencia del cDNA del receptor es idéntica a la del páncreas. En cambio se cree que en tejidos periféricos importantes en el intercambio o utilización de la glucosa como el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, no se expresa la forma pancreática del receptor de GLP-1 (Wei y Mojsov, 1995). Existe un 90% de homología entre el receptor humano (Dillon, y cols., 1993) y el receptor de rata (Thorens, 1992). El gen humano del receptor de GLP-1 se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 6 (6p21) (Fehmann, y cols., 1995). Se han identificado mensajeros del receptor de GLP-1, en islotes, pulmón, riñón, estómago y cerebro de humanos y roedores (Thorens, 1992; Wheeler, y cols., 1993; Bullock, y cols., 1996; y Alvarez, y cols., 1996; Navarro, y cols., 1996; Wei, y Mojsov, 1995; Fehmann, y cols., 1995; Thorens, y cols., 1993; Dillon, y cols., 1993),

El receptor de GLP-1 se ha identificado mediante ensayos de unión en estómago de rata (Schmidler, y cols., 1994), preparaciones de membrana de neumocitos (Ritcher, y cols., 1993) y diferentes áreas cerebrales (Calvo, y cols., 1995; Uttenthal y cols., 1992), mientras que en humanos se ha encontrado en corazón (Wei, y Mojsov, S., 1995), páncreas, pulmón, cerebro, estómago y riñón. (Dillon, y cols., 1993)

En algunos tejidos como en tejido adiposo de rata y humano (Mérida, y cols., 1993), músculo esquelético (Delgado, y cols., 1995) y hepatocitos de rata (Villanueva-Peñacarrillo, y cols., 1995) se han descrito efectos fisiológicos producidos por GLP-1(7-36)amida, pero desconocemos si estas acciones son mediadas por una isoforma diferente del receptor.

El receptor de GLP-1 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por tener un extremo amino terminal extracelular, que contiene tres sitios

de N-glicosilación en los residuos de asparagina 68, 88 y 120 (Dillon, y cols., 1993), y siete dominios transmembranales que comprenden los segmentos 146-167, 177-196, 228-246, 268-287, 304-325, 352-371 y 388-407. El extremo carboxilo terminal de este receptor se sitúa en el interior celular y comprende los residuos 408-463, implicados en el proceso de endocitosis. Contiene también los residuos implicados en la regulación por modificación covalente mediante fosforilación y que regulan su señalización (Figura 2).

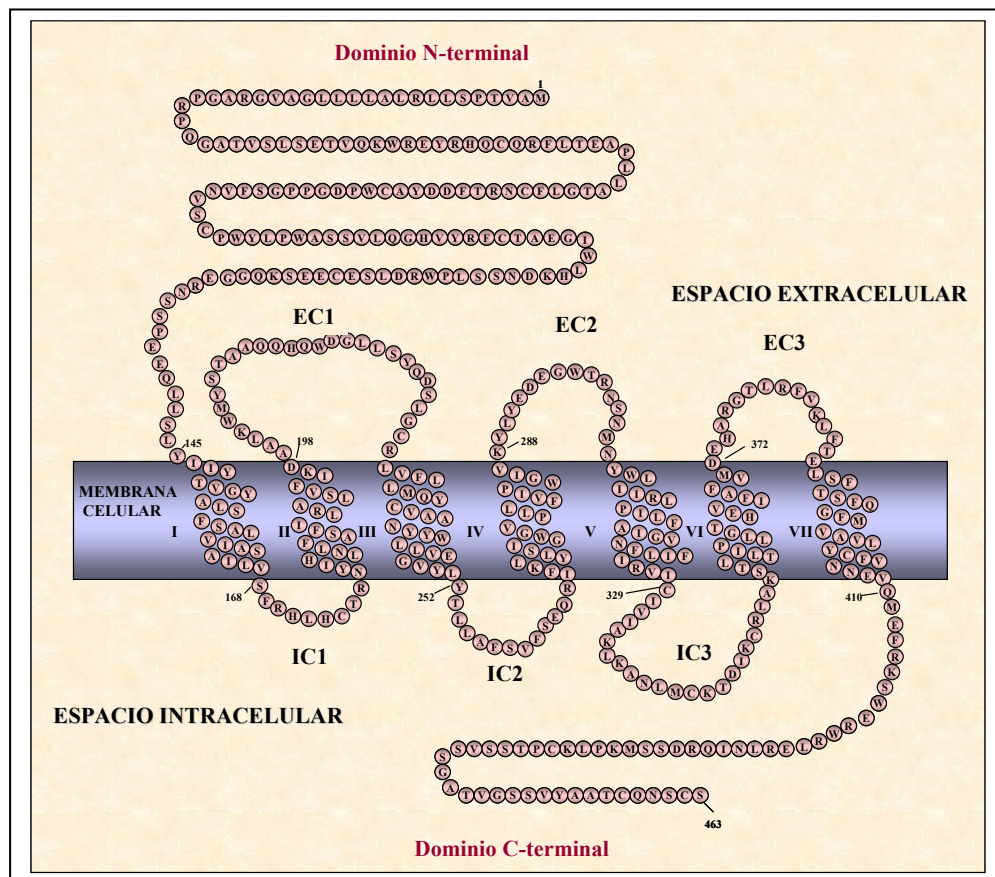


Figura 2.- Esquema representativo del receptor de GLP-1

Dentro de esta gran familia, el receptor de GLP-1 tiene una gran homología con aquellos del polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), calcitonina, hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRP), secretina, hormona paratiroidea (PTH), péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), glucagón, y GLP-2 (Thorens, 1992) La homología entre estos receptores es más patente en las regiones transmembranales.

El receptor de GLP-1 puede sufrir un procesamiento diferente según el tejido, como lo prueban los estudios de identificación de los complejos ligando-receptor (“cross-

linking”) realizados por Blázquez, y cols., en 1998, en los que demostraron la existencia de receptores con distinta movilidad electroforética entre hipotálamo y diferentes líneas celulares transfectadas con el receptor de GLP-1, a pesar de que la secuencia de aminoácidos fue idéntica (Alvarez, y cols., 1996)

El receptor de GLP-1 presenta una gran especificidad por su ligando siendo incapaz para detectar péptidos como el GIP, VIP o secretina.

1.2.2.- Acciones fisiológicas del GLP-1

Las acciones biológicas del GLP-1 se manifiestan en diferentes tejidos. En páncreas la principal función de las formas truncadas del GLP-1 es la estimulación de la secreción de la insulina dependiente de glucosa y sólo cuando la concentración de glucosa es mayor de 5,5 mM (Göke y cols., 1993). Se ha demostrado que existen, sitios de unión específicos para el GLP-1 en membranas de células INS-1 y de insulinoma de hamster (Kieffer, y cols., 1996; Marie, y cols., 1996). También se ha detectado expresión del ARNm del receptor de GLP-1 en el páncreas de rata y concretamente en las células β de los islotes de Langerhans (Moens, y cols., 1998).

La estimulación de la secreción de insulina se produce como respuesta al aumento de los productos resultantes de la digestión, tales como la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. Esta liberación es modulada por las incretinas, producidas por células enteroendocrinas, y que estimulan la secreción de insulina. Las incretinas más abundantes son el péptido GIP (polipéptido inhibidor gástrico) y el GLP-1, que producen un 20% y un 80 % respectivamente del efecto total de las incretinas (Holst, y cols., 1994).

El GLP-1 actúa como un modulador del sistema de señalización de glucosa en la célula β , regulando enzimas y canales iónicos que normalmente median la acción estimuladora de la glucosa sobre la síntesis y secreción de insulina. La unión del GLP-1 a su receptor en la célula β estimula la formación del segundo mensajero AMPc (Thorens, 1992), proceso regulado por la concentración de sodio extracelular. Este AMPc activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) implicada en la fosforilación de varios componentes de la cascada de señalización de la glucosa y de la regulación de los canales de potasio dependientes de ATP (Holz, y cols., 1995). Además la glucosa es capaz de modular los canales de potasio debido al ATP generado en la glucólisis. Estos dos fenómenos favorecen el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP permitiendo así una despolarización de la célula β y favoreciendo la apertura de los canales de calcio

dependientes de voltaje. El aumento del calcio intracelular incrementa los fenómenos de exocitosis (Wheeler, y cols., 1993).

Además, el GLP-1 estimula la secreción de somatostatina, por las células δ de los islotes pancreáticos y, como consecuencia de ello, se produce una disminución de la secreción de glucagón .

En estómago, Uttenthal, y Blázquez, en 1990 mostraron la existencia de una alta especificidad de unión del GLP-1(7-36)amida por su receptor en las glándulas gástricas, lo que facilita el efecto inhibitor del péptido sobre la secreción ácida. Este efecto puede ser también debido a la acción indirecta del GLP-1(7-36)amida, que promueve la liberación de somatostatina, o bien por el efecto inhibitor sobre la liberación de la gastrina. Del mismo modo el GLP-1(7-36)amida es capaz de promover la inhibición de la motilidad gástrica (Schjoldager, y cols., 1989; Wettergren, y cols., 1993).

En el pulmón se han descrito concentraciones elevadas de receptores de GLP-1 y varias funciones para el péptido. Así se han identificado sitios de unión en las glándulas de la submucosa de la tráquea, músculo liso de las arterias pulmonares y en los neumocitos de tipo II. La unión del agonista a estos receptores favorece la relajación de los anillos traqueales y de las arterias pulmonares (Ritcher, y cols., 1993). En las glándulas de la submucosa de la tráquea, el GLP-1 provoca un incremento de la secreción mucosa y un aumento de la relajación de los músculos traqueales (Ritcher, y cols., 1993). Los neumocitos de tipo II son los encargados de la secreción del surfactante pulmonar que es una mezcla compleja de fosfolípidos y proteínas que reducen la tensión superficial de los alvéolos y evitan el colapso de los mismos al final de la fase de espiración. El GLP-1(7-36)amida estimula la secreción del surfactante pulmonar en neumocitos tipo II de rata y este efecto es mediado a través de un mecanismo dependiente de AMPc (Benito, y cols., 1998), lo cual también ocurre en los neumocitos tipo II de humanos (Vara, y cols., 2001).

Por otro lado se ha descrito la unión de GLP-1(7-36)amida a membranas solubilizadas de tejido adiposo (Valverde, y cols., 1993), lo que da soporte a estudios previos indicativos de que el tratamiento del tejido adiposo con el GLP-1(7-36)amida estimula la síntesis de glicerol así como la producción de AMPc y la síntesis de ácidos grasos, sugiriendo que este péptido podría estar implicado en la regulación del metabolismo lipídico (Ruiz-Grande, y cols., 1992).

Otra función destacable del GLP-1 viene dada por su implicación en la fisiología del sistema cardiovascular, ya que tanto la exendina-4 como el GLP-1 produjeron un aumento de la presión sanguínea tanto sistólica como diastólica de manera dependiente de

la dosis (Barragán, y cols., 1994). Estos efectos fueron bloqueados por tratamiento con el antagonista exendina (9-39) (Barragán, y cols., 1996). Tanto el péptido, como su receptor han sido identificados también en el núcleo del tracto solitario y en el área postrema (Uttenthal, y cols., 1992; Göke, y cols., 1995), regiones implicadas en el control central de la función cardiovascular.

En hepatocitos aislados de rata la presencia de GLP-1(7-36)amida estimuló la síntesis de glucógeno (Valverde, y cols., 1994), lo que podría ser explicado por la existencia de sitios de unión específicos de GLP-1(7-36)amida en hepatocitos de rata y preparaciones de membrana hepáticas (Villanueva-Peñacarrillo, y cols., 1995).

El GLP-1 es también capaz de unirse a membranas de músculo esquelético de rata (Delgado, y cols., 1995). En este tejido puede estimular la síntesis de glucógeno, oxidación de la glucosa y la formación de lactato (Villanueva-Peñacarrillo, y cols., 1994).

Además de todos los efectos fisiológicos atribuibles al péptido GLP-1(7-36)amida en tejidos periféricos se ha estudiado su papel a nivel del sistema nervioso central. Estudios realizados por diferentes autores, indicaron la presencia de receptores específicos para GLP-1(7-36)amida en hipotálamo, núcleo del tracto solitario, y el núcleo talámico paraventricular posterior y un menor número de receptores en zonas del tallo cerebral e hipófisis. (Calvo, y cols., 1995; Uttenthal, y cols., 1992; Campos, y cols., 1994; Göke, y cols., 1995). La identificación del mRNA del receptor de GLP-1 por estudios de "hibridación *in situ*", confirmó su presencia en neuronas y en células gliales del tálamo, hipotálamo, hipocampo, corteza olfatoria primaria, plexo coriónico e hipófisis (Alvarez, y cols., 1996; Navarro, y cols., 1996; Bullock, y cols., 1996).

La presencia del GLP-1(7-36)amida y receptores de GLP-1 en diferentes áreas del cerebro sugirió que este péptido podría actuar como un neurotransmisor y/o neuromodulador (Blázquez, y cols., 1998). En la actualidad conocemos que algunos de los efectos fisiológicos del GLP-1(7-36)amida son mediados a través del sistema nervioso central, dado que el GLP-1(7-36)amida estimula la liberación selectiva de neurotransmisores. La perfusión con GLP-1(7-36)amida de los ganglios basales de rata produjo un aumento inmediato en los niveles extracelulares de glutamina y de ácido glutámico, y no se observaron variaciones en los niveles de ácido aspártico, glicina o serina (Mora, y cols., 1992) lo que sugiere un efecto directo del péptido sobre astrocitos y neuronas glutaminérgicas. Estos efectos pueden ser mediados bien por el GLP-1(7-36)amida sintetizado en el cerebro o por el péptido de origen intestinal. Se ha descrito que el GLP-1(7-36)amida puede entrar en el cerebro a través del órgano subfornical y el área

postrema (Orskov, y cols., 1996), zonas carentes de barrera hematoencefálica. La existencia de un elevado número de receptores de GLP-1 en el plexo coroideo podría también facilitar la vehiculación del péptido de origen periférico.

Este péptido también puede modular la ingesta de alimentos y bebidas a través de mecanismos centrales (Turton, y cols., 1996; Navarro, y cols., 1996; Lambert, y cols., 1994) y periféricos. El GLP-1(7-36)amida pertenece junto con la leptina, colecistoquinina (CCK), factor liberador de corticotropina, GLP-2 y otros, a la familia de péptidos con propiedades anorexigénicas. La administración intracerebroventricular o subcutánea de GLP-1(7-36)amida y exendina-4 redujeron la ingesta de alimentos. Algunas áreas hipotalámicas coordinan y regulan actividades endocrinas metabólicas así como la conducta alimentaria. Concretamente en zonas como el núcleo hipotalámico ventromedial, dorsomedial y núcleo arcuato se ha caracterizado el receptor de GLP-1 (Calvo, y cols., 1995). Esta distribución anatómica está relacionada con la existencia en estas regiones cerebrales de otros péptidos también implicados en la regulación de la ingesta como son entre otros la galanina y el neuropéptido Y. Estudios de “*hibridación in situ*” han demostrado que existe además una co-localización del mRNA del receptor de GLP-1, glucoquinasa y GLUT-2 en determinadas áreas del cerebro de rata tales como los núcleos hipotalámico lateral y ventromedial (Alvarez, y cols., 1996 y Rodríguez de Fonseca, y cols., 2000). En las células β -pancreáticas, tanto los receptores de GLP-1, como el GLUT-2 y la glucoquinasa, proteínas implicadas en el transporte y la fosforilación de glucosa respectivamente, forman parte del sistema sensor de glucosa. La co-localización de receptores de GLP-1 con el GLUT-2 y la glucoquinasa, en neuronas hipotalámicas sugieren la participación de estas proteínas en un sistema sensor en el SNC que detecte los niveles de glucosa necesarios para la regulación de las actividades metabólicas y de ingesta de alimentos. Neuronas localizadas en estas áreas son capaces de responder a variaciones de la concentración de glucosa en el medio extracelular, de una manera similar a la célula β (Yang, y cols., 1999).

Del mismo modo, mediante la administración intracerebroventricular de altas dosis del péptido, se ha mostrado que el GLP-1(7-36)amida puede participar en la regulación central de la temperatura corporal (O’Shea, y cols., 1996), en la inhibición de la secreción y motilidad gástrica, (Schojoldager, y cols., 1989; Wettergren, y cols., 1993) y en la regulación de la presión arterial (Barragan, y cols., 1996).

2.- MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LA FAMILIA DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR)

2.1.- Características de los receptores acoplados a proteínas G

La unión del ligando al receptor origina un cambio conformacional en el receptor que permite su unión a proteínas G, desencadenando con ello una serie de procesos que producen alteración en las concentraciones de segundos mensajeros intracelulares. Los receptores de esta familia están formados por siete dominios hidrofóbicos que se conectan entre si por bucles hidrofílicos intra y extracelulares de manera alternante. Los dominios transmembranales se disponen en forma de alfa hélice y son regiones bastante conservadas entre todos los receptores de esta familia. Los dominios intracelulares son especialmente importantes en la interacción del receptor con proteínas de señalización y para la regulación de la transmisión de la señal. En algunos receptores como los adrenérgicos, muscarínicos y serotoninérgicos, las regiones N- y C- terminales del tercer lazo intracelular están implicadas en el acoplamiento y activación de diferentes proteínas G (Strader, y cols., 1989), que son las responsables del inicio de la señalización, al igual que lo descrito para el receptor de GLP-1 (Hällbrink, y cols., 2001). Existen diferentes clases de receptores acoplados a proteínas G, en función de la longitud de sus extremos C y N-terminales y de los residuos que contienen. En el extremo amino terminal están muy conservadas seis cisteínas que son importantes en el proceso de unión con el ligando, ya que forman puentes disulfuro intramoleculares que mantienen la topología necesaria para dicha unión (Gaudin, y cols., 1995). También se mantienen entre la mayoría de los miembros de esta familia, dos cisteínas en los lazos extracelulares 1 y 2 y aproximadamente otros 15 residuos muy bien conservados entre los miembros de dicha familia (Laburthe, y cols., 1996).

2.2.- Proteínas G

Las proteínas G pertenecen a una gran familia de proteínas que son capaces de unir nucleótidos de guanina e hidrolizarlos. Se pueden clasificar en 3 grandes grupos según su estructura y función:

- Las proteínas G heterotriméricas.- Se encuentran situadas sobre todo en la membrana plasmática aunque también se ha descrito su presencia en la membrana de otros orgánulos intracelulares (García Higuera, y cols., 1994).

- Los factores de iniciación y elongación.- Son proteínas G monoméricas que intervienen en la síntesis de proteínas. Entre ellas están los factores de elongación EF-G y EF-Tu (Abel, y Jurnak, 1996).

-La superfamilia de las proteínas Ras. Son también proteínas G monoméricas de baja masa molecular (20-29 kDa), implicadas en el crecimiento y diferenciación celular (Dhanasekaran, y cols., 1998).

Las proteínas G heterotriméricas están localizadas en la cara interna de la membrana plasmática y son capaces de interactuar con un gran número de receptores de neurotransmisores y hormonas, y transmitir la información al interior celular mediante el acoplamiento con una serie de efectores específicos, como enzimas y canales iónicos, que son los encargados de producir segundos mensajeros.

Están constituidas por 3 subunidades: la *subunidad α* , de 40 a 55 kDa, la *subunidad β* de 36 kDa y la *subunidad γ* de 6 a 8 kDa. Se han descrito hasta 20 subunidades α diferentes, 5 subunidades β , y 12 subunidades γ . Las proteínas G se pueden clasificar atendiendo al grado de similitud en la secuencia de los aminoácidos de la subunidad α , en cuatro clases diferentes: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$ (Dhanasekaran, y cols., 1998).

La subunidad $G\alpha$ intercambia nucleótidos de guanina, posee actividad GTPasa intrínseca y es capaz de reconocer al efector. En situación de reposo las proteínas G heterotriméricas unen GDP. La unión del ligando al receptor favorece un cambio conformacional, de manera que promueve la asociación del receptor con la subunidad α de la proteína G, lo que a su vez da lugar a un cambio conformacional en la región C-terminal de dicha subunidad y permite el intercambio del GDP unido por GTP. La liberación de GDP provoca también la disociación del complejo $G\beta\gamma$ de la subunidad $G\alpha$ y de la proteína y posteriormente la unión del GTP a la subunidad α . La actividad GTPasa de la subunidad α , hidroliza el GTP finalizando esta activación por la asociación de nuevo del heterotrímero. El proceso de activación de las proteínas G, se representa en la figura 3.

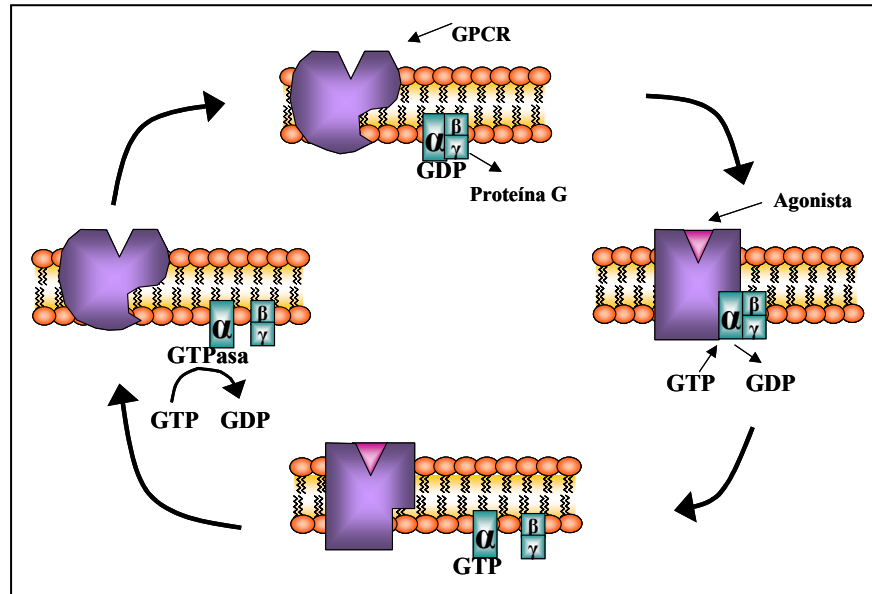


Figura 3.- Esquema representativo de la activación de las proteínas G.

2.3.- Cascadas enzimáticas implicadas en la formación de segundos mensajeros

La unión del agonista al receptor favorece la disociación de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ y estas pueden modular la actividad de uno ó más efectores, como la adenilato ciclasa, fosfolipasas, fosfodiesterasas y canales iónicos. La actividad de estos efectores enzimáticos y canales iónicos regulan la concentración intracelular de segundos mensajeros tales como AMPc, diacilglicerol (DAG), inositol trifosfato (IP_3), e iones. Como indicamos anteriormente existen diferentes tipos de subunidades α , que van a regular la actividad de uno o mas efectores. Así la $G\alpha_s$, es capaz de activar la adenilato ciclasa, canales de calcio y canales de sodio. La $G\alpha_o$, inhibe la fosfolipasa C (PLC). La $G\alpha_i$ activa canales de potasio, canales de calcio, inhibe la adenilato ciclasa y PLC, la $G\alpha_q$ activa principalmente la PLC, y la $G\alpha_{12}$, está implicada en la activación de pequeñas GTPasas. (Radhika., y Dahanasakaran, 2001). Además recientemente se ha visto que el dímero $G\beta\gamma$ es capaz de activar o inhibir la adenilato ciclasa, activar varias isoformas de PLC- β y regular la actividad de canales iónicos en algunos tejidos.

2.3.1.- Señalización vía de la adenilato ciclasa

La vía de la adenilato ciclasa es una de las principales cascadas de señalización que siguen los receptores acoplados a proteínas G. Para dicha activación es fundamental el

acoplamiento del ligando al receptor, que desencadena la interacción del receptor con la proteína $G\alpha_s$ capaz de activar la adenilato ciclasa. La adenilato ciclasa está localizada en la cara interna de la membrana plasmática y cataliza la conversión del ATP en AMPc y PPi. El segundo mensajero AMPc estimula la actividad de determinadas proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) que son capaces fosforilar residuos específicos de serina/treonina, regulando así la actividad de diferentes proteínas celulares (Figura 4). Las PKAs son tetrámeros que tienen dos subunidades reguladoras y dos catalíticas, y en este estado el tetrámero es inactivo. Cuando el AMPc se une a las subunidades reguladoras, se disocian las subunidades reguladoras de las catalíticas, que son las encargadas de fosforilar de manera específica otras proteínas. La activación de esta vía se mantiene mientras se encuentre el GTP unido a la proteína $G\alpha_s$. El GTP se puede hidrolizar de manera lenta debido a la acción GTPasa de la subunidad α , y así el GTP se convierte en GDP, perdiendo la capacidad de estimulación de la adenilato ciclasa. La hidrólisis del GTP provoca un cambio conformacional que promueve la disociación de la subunidad α de la adenilato ciclasa, favoreciendo la terminación de la señal, y por lo tanto la reasociación de la $G\alpha_i$ con $G\beta\gamma$ (Figura 4). La subunidad $G\alpha_i$ actúa sobre la adenilato ciclasa acoplándose a otra región, de manera que se inhibe la formación de AMPc.

La PKA activada puede a su vez alterar la actividad de muchas proteínas por fosforilación en residuos de serina y treonina. Otras proteínas quinasas pueden ser también sustratos de la PKA que se activan y ponen en marcha reacciones en cascada. Los efectos del AMPc están también regulados por la acción de la fosfodiesterasa (PDE) de AMPc que hidroliza el AMPc para dar lugar a 5'AMP. Este modelo sencillo no explica como una única vía de transducción intracelular, compartida por muchos ligandos que poseen receptores específicos en la membrana celular, puede regular múltiples respuestas celulares. En la actualidad se conocen nueve isoformas de la adenilato ciclasa y treinta de la fosfodiesterasa implicadas en la síntesis y degradación del AMPc. Existen también distintos tipos de la PKA por combinación de diferentes subunidades catalíticas con dos tipos de subunidades reguladoras. La PKA puede localizarse en el citoplasma o asociada a membranas intracelulares, lo que permite fosforilar proteínas localizadas en diferentes compartimientos de la célula: proteínas citosólicas, canales iónicos, el propio receptor y factores de transcripción. La variedad de adenilato ciclasa, fosfodiesterasas y PKA y su expresión selectiva en cada tipo celular permite la elaboración de respuestas celulares específicas.

La localización de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) depende asimismo de la asociación con unas proteínas adaptadoras o proteínas de anclaje de la quinasa A (AKAPs) que dirigen a esta quinasa intracelular a las estructuras u orgánulos intracelulares sobre los que va a ejercer su acción. (Mochly-Rosen, 1995; Pawson, y Scott, 1997). Existen diferentes tipos de AKAPs en función del sitio en el que se localicen, como la AKAP18 que sirve de anclaje de la PKA a la membrana plasmática. (Fraser, y cols., 1998)

2.3.2.- Señalización por la cascada del fosfoinosítido

Algunos receptores acoplados a proteínas G son capaces de activar también otra vía que está mediada por la activación del enzima fosfolipasa C (Figura 4). Los receptores que activan esta vía interaccionan con proteínas G que poseen subunidades $G\alpha_q$ o $G\alpha_o$. Cuando un ligando se une a uno de sus receptores, la disociación de la subunidad $G\alpha_q$ o $G\alpha_o$ activa o inhibe la PLC. Esta enzima cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol 4-5 bisfosfato (PIP_2) para dar lugar a DAG y a IP_3 , que pueden actuar como segundos mensajeros. El IP_3 es soluble y capaz de transmitir la señal desde la membrana al retículo endoplásmico. Allí se une a su receptor y provoca la apertura de canales de calcio favoreciendo la salida de iones calcio al citosol. El incremento de la concentración de calcio en el citosol induce múltiples efectos, entre ellos la activación de la calcio/calmodulina quinasa. La calmodulina es también una subunidad de la óxido nítrico sintasa. Una de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos que degrada AMPc es también dependiente de calcio/calmodulina. Así pues existen regulaciones mutuas entre los dos sistemas de señales. Los efectos del IP_3 desaparecen por la acción de fosfatasas dando lugar al inositol. Además parte del IP_3 es fosforilado por la IP_3 quinasa para originar el inositol 1,3,4,5 tetrafosfato (IP_4) que regula algunas de las respuestas hormonales mas lentas o prolongadas, y también facilita la entrada de iones calcio desde el fluido extracelular. Además el aumento de calcio permite la apertura de canales de potasio en la membrana plasmática, de manera que hiperpolariza la membrana, disminuyendo la concentración de potasio en el interior celular.

El otro producto resultante de la activación de la PLC, el DAG permanece unido a la membrana y su función fundamental es activar una serie de proteínas quinasas de la membrana plasmática llamadas proteínas quinasas dependientes de calcio (PKC). En ausencia de ligando las PKC se encuentran en el citosol, y son catalíticamente inactivas. El

aumento de calcio provocado por el IP_3 , junto con el DAG favorece el movimiento de la diferentes isoformas de la PKC a la membrana, activándose por la unión con las fosfatidilserinas de la membrana celular. La activación de la PKC y calcio/calmodulina quinasa (CaMK) promueve la fosforilación y regulación de la actividad de múltiples proteínas celulares en los diferentes tejidos que generaran una respuesta celular específica.

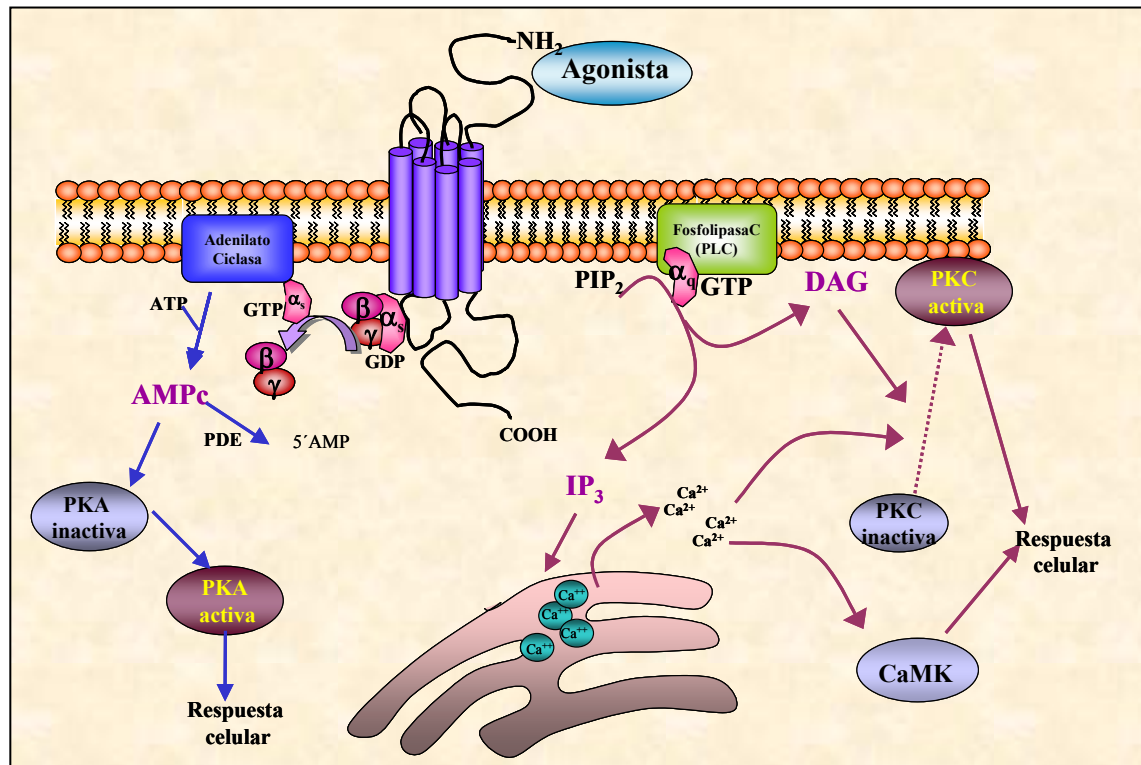


Figura 4- Diagrama representativo de las dos vías principales de señalización llevadas a cabo por los GPCRs.

2.4.- Señalización a través de la vía de las MAPKs

Muchos receptores de factores de crecimiento están acoplados con vías de señalización, que regulan la actividad de alguna de las quinasas que se encuentran en la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Robinson, y Cobb, 1997). Las MAPKs son proteínas citoplasmáticas que transmiten señales extracelulares a través de una serie de fosforilaciones en cadena en la que participan varias quinasas que, una vez activadas, se translocan al núcleo para regular factores de transcripción o permanecen en el citosol (Cobb, y cols., 1995; Davis, 1995 y Montrose-Rafizadeh, y cols., 1999). Pequeñas

proteínas G como las proteínas Ras transmiten la información desde los receptores de factores de crecimiento en la superficie celular, amplificando la señal a través de diferentes proteínas quinasas que se regulan unas a otras. El final de esta cascada incluye factores de transcripción que regulan genes implicados en el crecimiento, diferenciación celular y en los procesos inflamatorios.

Esta vía de señalización comienza con la activación de la proteína monomérica Ras, que activa a la serina/treonina quinasa Raf-1 mediante la unión al dominio amino terminal de esta. La Raf-1 activada se une y fosforila a MEK que a su vez activa, mediante fosforilación en residuos de serina y tirosina a MAPK (Figura 5). Dentro de la familia de las MAPK quinasas existen tres subfamilias que son las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), proteína quinasa que fosforila a c-Jun (JNK/) y p38 MAPK. Se han identificado un gran número de receptores acoplados a las proteínas G (GPCRs) que son capaces de inducir la activación de dos miembros de la superfamilia de las MAP quinasas: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y p38 MAP quinasa (Yamauchi, y cols., 1997) (Figura 5). Estudios realizados por Daaka, y cols., en 1998 demostraron que, al igual que la activación clásica de la adenilato ciclasa y la PLC mediada por GPCRs ocurre en la membrana plasmática, la activación de las MAP quinasas requiere la endocitosis de estos receptores. La inhibición de la endocitosis bloqueó la fosforilación de la MAPK, pero no afectó a los procesos que ocurren en la membrana plasmática, como es el acoplamiento a las proteínas G.

Los GPCRs regulan la vía de las MAPKs mediante diferentes mecanismos. Así se ha visto que algunos receptores acoplados a la proteína $G\alpha_s$, inhiben la vía de las MAPK a nivel de Raf-1, ya que la PKA activada por el aumento de AMPc intracelular es capaz de fosforilar a Raf inactivándola y por lo tanto disminuyendo la activación de las proteínas MEK y ERK. Los GPCRs que se acoplan a $G\alpha_i$, activan a miembros de la familia de MAPKs. Aquellos GPCRs que median su señal a través de la subunidad $G\alpha_q$, activan por un lado a la PKC, (Marais, y cols., 1998) que puede estimular a ERK a través de Raf. Por otro lado se produce un aumento de IP_3 que es capaz de aumentar la concentración de calcio intracelular y activar así la calcio/calmodulina quinasa, que fosforila una serie de tirosinas quinasas de manera que se activa Ras y por consiguiente ERK (Bourne, 1995). La mayoría de los GPCRs activados por agonistas activan las formas ERK1/2 pero no inducen su translocación al núcleo, y por lo tanto no tienen efectos en la proliferación (Pouyssegur, y Böhm, 1992), aunque si pueden actuar sobre un número importante de sustratos citoplásmicos (DeFea, y Roth, 1997). Además algunos factores de transcripción

son fosforilados en el citoplasma y translocados al núcleo después de su fosforilación (Chen, y cols., 1992).

Recientemente se ha observado que los GPCRs pueden activar a las MAPKs de manera dependiente del proceso de endocitosis y por lo tanto de la presencia de proteínas como la β -arrestina (Barlic, y cols., 2000) (figura 5). El complejo formado por el receptor internalizado, la arrestina, Raf-1 y ERK es necesario para la activación de las formas ERK1/2. Así para la activación de las MAPKs por el receptor β_2 AR y el receptor muscarínico de tipo 1 es necesaria la endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina. (Vogler, y cols., 1999). La translocación al núcleo de ERK1/2 se produce cuando ERK está dimerizado (Khokhlatchev, y cols., 1998). El complejo formado por la arrestina y Raf, secuestra a ERK1/2 para evitar su dimerización, prolongar su unión con MEK1 y evitar así su interacción con proteínas transportadoras. También ERK1/2 citosólico puede fosforilar a la β -arrestina inhibiendo su capacidad de mediar la endocitosis y la vía de las MAPKs. (Lin, y cols., 1999)

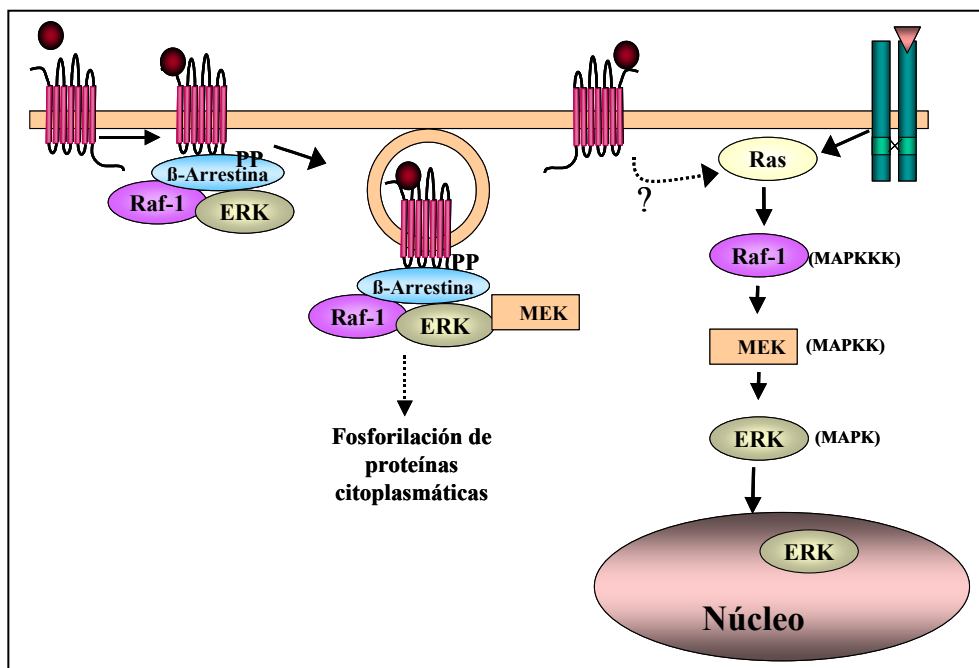


Figura 5.- Modelo de activación de la cascada de MAPKs de manera dependiente e independiente de la β -arrestina.

3.- REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Una de las propiedades más importantes de los receptores acoplados a proteínas G es que, tanto su función como su localización celular, están sujetas a regulación por diferentes mecanismos, lo que confiere al sistema de una gran plasticidad y dinamismo.

Las formas de regulación más ampliamente estudiadas son aquéllas que tienden a atenuar la capacidad de respuesta celular tras la estimulación prolongada por un agonista, y que permiten modular la información a través de los receptores que integran las señales mediante segundos mensajeros. Esto se conoce como *fenómenos de desensibilización* y transcurren en muchos casos, con la fosforilación del receptor y en otros, con el secuestro de los mismos en el interior celular.

De manera general debe existir en todos los receptores un balance entre los mecanismos de señalización, desensibilización y resensibilización. La desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G se ha estudiado en muchos tipos de receptores, y se puede decir que dicho proceso incluye:

- Desacoplamiento del receptor de las proteínas G, generalmente debido a fenómenos de fosforilación del receptor.
- Secuestro del receptor, o lo que es lo mismo, internación de receptores asociados a la membrana plasmática tras su estimulación.
- Fenómenos de “down-regulation”, disminución del número de receptores en la superficie celular, bien por internación y degradación lisosomal del receptor tras su estimulación por el agonista o bien por disminución de la síntesis de su ARNm.

3.1.- Desacoplamiento de los receptores de proteínas G

Uno de los mecanismos más importantes en la desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G es el desacoplamiento de dichos receptores de las proteínas G heterotriméricas. Este proceso de desensibilización es debido generalmente a una modificación covalente del receptor como consecuencia de su fosforilación por una serie de quinasas específicas y es el que ocurre de una manera más rápida. La fosforilación se puede llevar a cabo por dos tipos de quinasas:

- Quinasas intracelulares dependientes de segundos mensajeros, como la quinasa dependiente del AMPc intracelular (PKA) o la quinasa dependiente del calcio (PKC).

- Quinasas específicas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs).

Recientemente se ha demostrado además la existencia de una familia de proteínas reguladoras de la señalización (RGS) que aumentan la hidrólisis del GTP unido a las subunidades $G\alpha_i$ y $G\alpha_q$, de manera que favorecen también la desensibilización del receptor (Dohlman, y Thorner, 1997).

3.1.1.- Desensibilización heteróloga

Las proteínas quinasas dependientes de segundos mensajeros como son la PKA y la PKC, son fosfotransferasas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a residuos de serina o treonina de la proteína sustrato que están situados en unas secuencias determinadas y son capaces de fosforilar los receptores de manera generalmente independiente de su activación por el agonista, provocando el desacoplamiento con la proteína G. Este tipo de desensibilización que sufre el receptor se denomina *heteróloga*.

Estas quinasas, las PKC y PKA, como se ha descrito anteriormente se activan como respuesta a un aumento en los niveles intracelulares de segundos mensajeros, generalmente como consecuencia de la estimulación de otros receptores. Estos segundos mensajeros pueden ser AMPc, calcio intracelular ó diacilglicerol. Estas quinasas actúan sobre sitios específicos en el GPCR, situados en un lazo intracelular o bien en el extremo carboxilo terminal. Excepcionalmente el efecto de estas quinasas depende de la activación del receptor por un agonista. Así se ha descrito que la activación de PKA, tras la estimulación del receptor β -adrenérgico, promueve la fosforilación de uno de los sitios consenso dentro de este receptor (Moffet, y cols., 1996).

3.1.2.- Desensibilización homóloga

La desensibilización homóloga está mediada por unas quinasas que fosforilan específicamente residuos de serina y treonina, tanto del tercer lazo intracelular como de dominios carboxi-terminales de algunos GPCRs, solo cuando el receptor está activado por su agonista. Se denominan quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) En aquéllos receptores cuyo extremo carboxilo terminal es largo, por ejemplo en el caso de la rodopsina o el receptor β -adrenérgico (Bouvier, y cols., 1988), fosforilan residuos de esta región y promueven la desensibilización provocando una disminución del 70-80% de la capacidad de estos receptores para activar las proteínas G (Fergusson, y cols., 1996). En

receptores cuyo extremo carboxilo terminal es mas corto, como en el caso del receptor muscarínico y α -adrenérgico, estas quinasas fosforilan residuos del tercer lazo intracelular (Nakata, y cols., 1994).

Las GRKs constituyen una familia de 7 proteínas serina/treonina quinasas que fosforilan receptores activados por el agonista (Pitcher, y cols., 1998). Todas estas GRKs están constituídas por un dominio amino terminal común a todas ellas, de 185 aminoácidos, un dominio catalítico en torno al aminoácido 263-266 y un dominio carboxilo terminal que es importante en el reconocimiento de su sustrato y el que determina la localización de dicha quinasa en la membrana o en el citosol. Este dominio es muy variable en longitud y estructura y puede sufrir modificaciones postraduccionales. Todas las GRKs se caracterizan porque:

- Fosforilan de manera preferente a receptores acoplados a proteínas G que son activados por agonistas.
- La interacción de las GRKs con su receptor activado por el agonista, favorece la activación de estas enzimas.
- En la fosforilación de GPCRs por GRKs intervienen una serie de mecanismos reguladores responsables de la localización de dichas quinasas en la membrana cerca del sitio de acción.

Las GRK1, GRK2 y GRK3 se localizan en el citosol celular cuando no hay estimulación por el agonista, y únicamente se translocan a la membrana en respuesta a la activación de un receptor por su agonista. La GRK1 debe sufrir un proceso de farnesilación para unirse a la membrana celular. Las GRK2 y GRK3, se translocan a la membrana por la asociación con el dímero $G\beta\gamma$ de las proteínas G (Pitcher, y cols., 1995). Las GRK4 y GRK6 sufren procesos de palmitoilación para ser funcionales (Stoffel, y cols., 1998) y la GRK5 se activa por autofosforilación y por la unión con los fosfolípidos de la membrana (Kunapuli, y cols., 1994). No se conoce el mecanismo de regulación de la GRK7.

Los sitios consenso de fosforilación por estas quinasas tienen diferentes características y así la GRK1 y la GRK2 fosforilan residuos flanqueados por aminoácidos acídicos (Onorato, y cols., 1991). La GRK5 y la GRK6 fosforilan principalmente serinas de receptores acoplados a proteínas G que se encuentran flanqueadas por aminoácidos básicos (Chen, y cols., 1993).

La fosforilación del extremo carboxilo terminal de receptores acoplados a proteínas G, por parte de GRKs, cuando el receptor es activado por el agonista, favorece el acoplamiento del receptor con las arrestinas, dando lugar a complejos “ligando-receptor fosforilado- β -arrestina”, lo que provoca el desacoplamiento del receptor de la proteína G heterotrimérica por impedimento estérico y favorece la finalización de la señal (Oakley, y cols., 1999). Existen cuatro familias de arrestinas en función de la secuencia que reconocen, de la distribución de tejido y de la función que desempeñan. Debido a que la fosforilación de los receptores por las GRKs ocurre en diferentes regiones del receptor, ya sea en el tercer lazo intracitoplasmático, o bien en el extremo carboxilo terminal, las arrestinas deben reconocer diferentes regiones y conformaciones del receptor. La molécula de arrestina es una proteína fundamental para la internación de GPCRs, siempre que se realice mediante vesículas recubiertas de clatrina.

3.1.2.1.- Las GRKs están reguladas por quinasas dependientes de segundos mensajeros (PKC y PKA)

Los procesos de fosforilación por quinasas dependientes de segundos mensajeros y por GRKs no son independientes sino que pueden interactuar entre sí de manera que las quinasas de segundos mensajeros pueden regular la acción de las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G.

En la actualidad se han caracterizado algunos de los procesos de regulación de GRKs por quinasas dependientes de segundos mensajeros. Se conoce que las quinasas GRK2 y la GRK5 se fosforilan por la PKC y este proceso modifica la actividad de estas enzimas (Chuang, y cols., 1995; Winstel, y cols., 1996 ; Pronin, y Benovic, 1997). La PKC fosforila a la GRK2 dando lugar a la activación del enzima lo que favorece la asociación de GRK2 con la membrana (Winstel, y cols., 1996). La PKC también fosforila la GRK5 pero este proceso provoca una disminución de su actividad catalítica y de su capacidad de unirse a algunas fracciones de membrana (Pronin, y Benovic, 1997).

La PKA también puede modular la actividad de GRKs. Se ha observado que la activación de la PKA promueve la desensibilización en receptores de los cilios olfatorios y que el inhibidor de la PKA no solo evita la desensibilización del receptor sino que además impide la translocación de la quinasa GRK3 a la membrana. Por lo que un aumento de AMPc intracelular facilitaría el acoplamiento de GRK3 a la membrana y por lo tanto la fosforilación del receptor (Schleicher, y cols., 1993).

3.2.1.- Mecanismo de Endocitosis

La endocitosis es un proceso que modula la respuesta celular a hormonas y a factores de crecimiento. Este proceso permite retirar los estímulos del medio extracelular, por disminución del número de receptores en la superficie celular y facilita que la célula de manera temporal, sea menos sensible a dicho estímulo. Hay dos tipos de endocitosis: la pinocitosis, que es la endocitosis de pequeñas gotas extracelulares, y la endocitosis mediada por el receptor, que permite la captación de manera selectiva de proteínas y moléculas extracelulares tras la unión a un receptor específico.

El principal mecanismo de internación de un GPCR promovida por la unión del agonista es mediante vesículas recubiertas de clatrina (representado en la figura 6). Durante el proceso de endocitosis, una pequeña región de la membrana plasmática denominada fosa recubierta se invagina y forma una vesícula que se libera al citosol, transportando en su interior el material extracelular a internalizar. La clatrina, que es una proteína fibrosa, es capaz de interactuar con el extremo carboxilo terminal del receptor activado por su agonista, gracias a unas proteínas adaptadoras (AP) que reconocen secuencias específicas en el receptor y permiten el anclaje de la molécula de clatrina a la membrana plasmática. Existen diferentes proteínas adaptadoras, la AP-1 se sitúa en la membrana del aparato de Golgi y la AP-2 en la membrana plasmática. (Chang, y cols., 1993; Peeler, y cols., 1993; Robinson, 1994; Traub, y cols., 1995).

Una vez unida la clatrina a una zona específica de la membrana se originan las denominadas fosas recubiertas y se produce la invaginación de las mismas, de manera que se forma, tras la unión del ligando, una vesícula recubierta por clatrina que contiene en su interior el complejo ligando-receptor. La escisión de la vesícula recubierta de la membrana plasmática es facilitada por la acción de una proteína con actividad GTPasa, que se denomina dinamina. Una vez en el interior celular las vesículas pierden su recubrimiento de clatrina por la acción de proteínas con actividad ATPasa denominadas Hsc 70. Las vesículas en estas condiciones se denominan vesículas endocíticas y pueden fusionarse con vesículas prelisosómicas o endosomas donde liberan su contenido.

Los endosomas son estructuras túbulo-vesiculares donde en general tiene lugar la disociación del complejo ligando-receptor, debido al pH ácido de su interior. Los complejos ligando-receptor o ligandos y receptores ya disociados pueden seguir diferentes rutas (Courtoy, 1993). Desde los endosomas ambos, ligando y receptor, pueden dirigirse a

los lisosomas donde son degradados, o bien el ligando puede dirigirse al lisosoma y el receptor reciclarse a la membrana plasmática y tener otros ciclos de endocitosis. El ligando y el receptor pueden también reciclarse a la membrana, mediante un proceso denominado retroendocitosis, que es característico del receptor de transferrina. En las células epiteliales tiene lugar un fenómeno denominado transcitosis, que consiste en que, tanto el ligando como el receptor, se dirigen al lado opuesto de la célula. La endocitosis de GPCRs requiere también la interacción con arrestinas. En ausencia de activación del receptor, la β -arrestina reside en el citosol. Cuando se activan dichos receptores, las β -arrestinas citosólicas se translocan a la membrana plasmática y la fosforilación estimulada por la unión del agonista favorece la interacción receptor-P- β -arrestinas. Laporte, y cols., en 1999 mostraron que en el caso del receptor β -adrenérgico, además de la β -arrestina y de la clatrina es necesaria la interacción con la β -adaptina que pertenece al complejo adaptador AP-2.

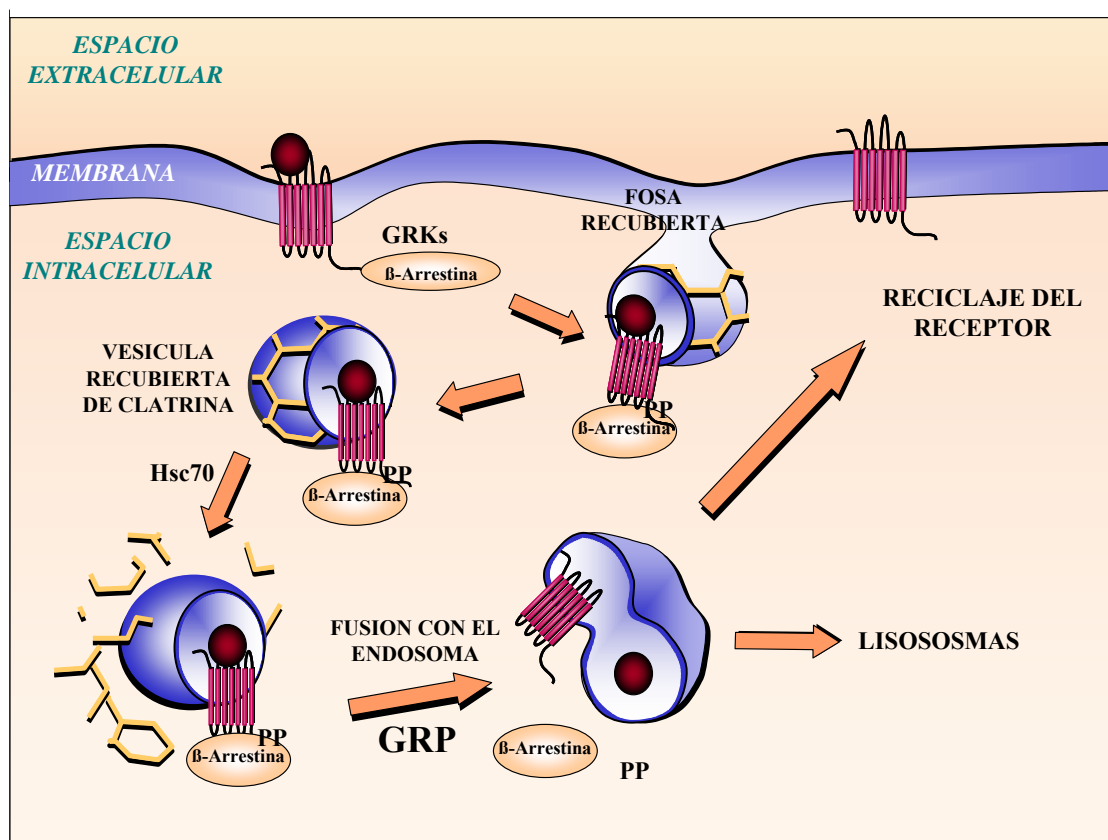


Figura 6.- Esquema representativo del mecanismo de endocitosis mediado por un GPCR dependiente de clatrina.

La interacción de los GPCRs con las β -arrestinas requiere la fosforilación del receptor por las GRKs, aunque no en todos los casos. Por ejemplo la β -arrestina facilitó la

endocitosis de receptores β -adrenérgicos a los que les faltaba el extremo carboxilo terminal y que no pudieron ser fosforilados por las GRKs (Ferguson, y cols., 1996). Por el contrario, en el caso del receptor muscarínico es imprescindible su fosforilación para la endocitosis, aunque no exista la molécula de arrestina. (Tsuga, y cols., 1994 ; Vogler, y cols., 1999). Recientemente se han descrito proteínas de anclaje que se unen a estructuras subcelulares aproximando y orientando correctamente los componentes (quinasas, fosfatasas, proteínas adaptadoras, etc.) que participan en el proceso de transducción de señales y endocitosis del receptor.

Aunque esta parece ser la vía principal de endocitosis mediada por el receptor se ha descrito que algunos receptores pueden utilizar una vía independiente de clatrina. La inhibición de la formación del enrejado de clatrina por tratamiento farmacológico, con sacarosa o por depleción de potasio, permite aún observar fenómenos de endocitosis para algunos receptores.

Los receptores internados a través de vesículas recubiertas de clatrina presentan en el dominio citoplasmático diferentes secuencias señal que interaccionan con las proteínas adaptadoras. Estas secuencias señal pueden ser residuos aromáticos (generalmente de tirosina) localizados cerca de cadenas hidrofóbicas (Trowbridge, y cols., 1993), así como residuos próximos a leucinas. La secuencia Asn-Pro-X_{2,3}-Tyr en el séptimo dominio transmembranal está muy conservada dentro de la familia de GPCRs (Böhm, y cols., 1997), y podría ser importante en el mantenimiento de una conformación apropiada del receptor para permitir su endocitosis o su señalización. También regiones ricas en serinas/treoninas son críticas para la internalización inducida por el agonista de muchos GPCRs que interaccionan con las arrestinas. (Hausdorff, y cols., 1991; Benya, y cols., 1993).

3.2.2.- Proceso de resensibilización

La resensibilización es un proceso importante, ya que una desensibilización prolongada e irreversible dejaría a la célula sin capacidad de respuesta ante un nuevo estímulo. Este proceso de resensibilización incluye la defosforilación de los GPCRs fosforilados que se encuentran en los endosomas. El complejo “ligando-receptor-P-arrestina” viaja hasta los endosomas desde la membrana plasmática. La defosforilación tiene lugar gracias a la acción de proteínas fosfatasas (GRP), que actúan de una manera mas o menos efectiva en función de la secuencia de los receptores. En algunos receptores

la interacción con las β -arrestinas es muy estable debido a que existen en su extremo carboxilo terminal abundantes cargas negativas y las fosfatasa realizan su función lentamente, una vez que tiene lugar la defosforilación se disocian los complejos ligando-receptor- β -arrestina. Algunos autores indican que la disociación del receptor y el ligando, tiene lugar muy cerca de la membrana plasmática, justo después de la formación de las vesículas recubiertas de clatrina.

Una vez que se disocian estos complejos, sitios específicos del extremo carboxilo terminal del receptor determinan si se dirigen a los lisosomas o a compartimentos endosomales para ser reciclados. Los receptores que son internalizados y dirigidos a los lisosomas mediarán una respuesta de manera transitoria al agonista, y los receptores que pueden ser reciclados a la membrana celular participan en nuevos ciclos de endocitosis.

4.- MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1

El receptor de GLP-1 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, como ya se explicó con anterioridad. Estudios recientes realizados por Xiao, y cols., en 2000, mostraron que los sitios de unión en el receptor para el péptido GLP-1(7-36)amida, se sitúan en el extremo amino terminal, en el dominio transmembranal 2, y en el primer lazo extracelular (ver figura 2). La interacción de la región amino del tercer lazo citoplasmático con la proteína $G\alpha_s$, permite el inicio de una de las vías de señalización llevadas a cabo por el receptor de GLP-1, como es la activación de la adenilato ciclasa, y la producción de AMPc como segundo mensajero. (Mathi, y cols., 1997). Montrose-Razfizadeh, y cols., en 1999 mostraron que la unión del GLP-1 a su receptor provocó un aumento de la incorporación de GTP-azidanilina en las subunidades $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, y $G\alpha_{i12}$, pero no en la $G\alpha_{i3}$. También otros dominios intracelulares son importantes en las interacciones con proteínas como las β -arrestinas, que contienen secuencias consenso para la fosforilación por GRKs y quinasas de segundos mensajeros, como la PKC, que median procesos de fosforilación y de desensibilización del receptor. (Rana, y cols., 2001) (figura 8). En algunas líneas celulares como, la línea COS-7, la estimulación del receptor permite también la activación de la PLC (Dillon, y cols., 1993). Los estudios realizados por Wheeler, y cols., en 1993, en la línea celular COS-7, pusieron de manifiesto que existe también una interacción del receptor con el sistema de la PLC y por lo tanto de la hidrólisis de PIP_2 dando lugar al IP_3 y diacilglicerol DAG. El IP_3 difunde al citoplasma y

favorece liberación de calcio desde los depósitos intracelulares. El DAG por otro lado activa la PKC que fosforila otras proteínas específicas.

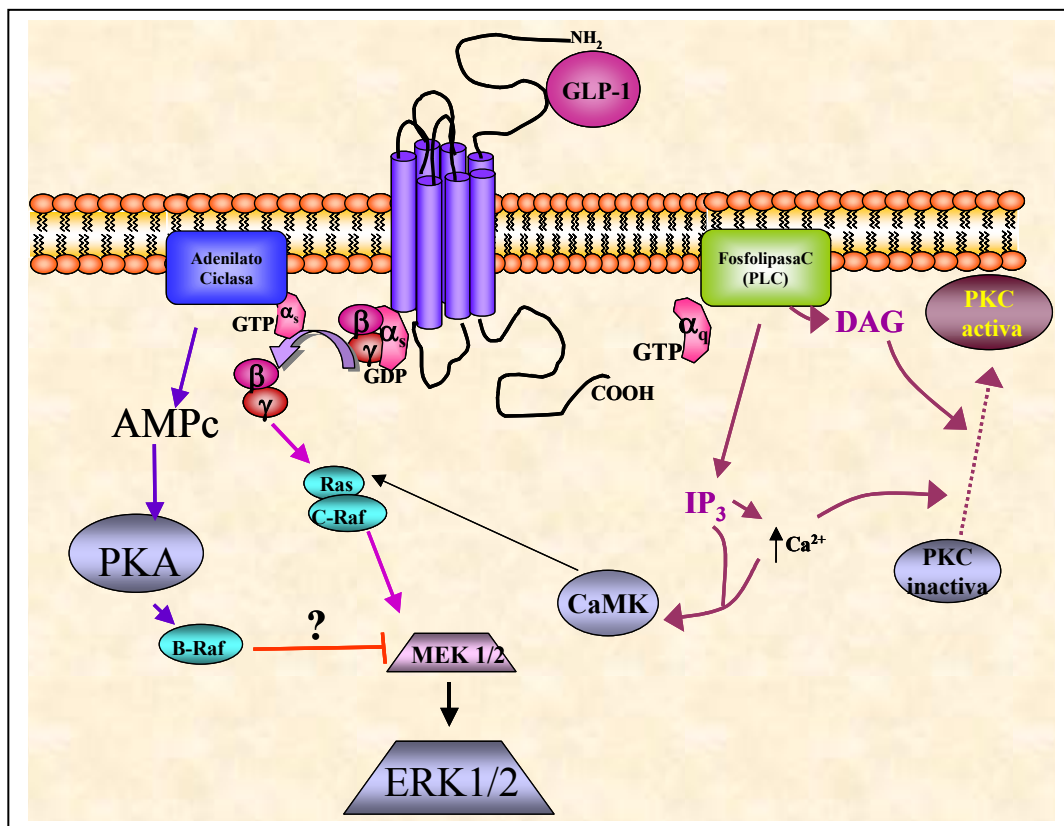


Figura 8.- Diagrama representativo de las rutas de señalización seguidas por el GLP-1 tras su unión con el receptor.

Uno de los efectos mas importantes producidos por el GLP-1(7-36)amida en la célula β es la estimulación de la secreción de insulina. La unión del GLP-1(7-36)amida a su receptor, provoca la estimulación de la adenilato ciclasa y la formación del principal segundo mensajero que es el AMPc. (Holz, y cols., 1995). Posteriormente se produce la activación de la PKA y la fosforilación de proteínas clave en el proceso de la secreción de insulina, bien de elementos del sistema sensor de glucosa en la célula β ó de componentes del proceso de exocitosis de la insulina (Widmann, y cols., 1996).

Estudios previos han demostrado que el GLP-1 puede modular por fosforilación las quinasas ERK1 y ERK2 de la vía de las MAP quinasas en células INS-1 (Frodin, y cols., 1995).

La desensibilización heteróloga del receptor de GLP-1 se produce por fosforilación catalizada por la PKC, que es capaz de fosforilar los cuatro dobles de serina localizados

en las posiciones 431/432, 441/442, 444/445, y 451/452. (Widmann, y cols., 1996a). De este modo la estimulación de la PKC por el éster de forbol PMA, produjo una disminución de hasta un 30% de la producción máxima de AMPc tras la estimulación del receptor por el agonista. También la desensibilización homóloga producida por la unión del agonista a su receptor, está muy relacionada con el nivel de fosforilación del extremo carboxilo terminal del mismo. Estudios realizados por Widmann, en 1997, indicaron que la unión del agonista producía una disminución de la producción máxima de AMPc de hasta un 20%, y las serinas implicadas del extremo carboxilo terminal serían: 441/442, 444/445, 451/452. En el caso del receptor de GLP-1 no se ha descrito cual de las GRKs está implicada en la desensibilización homóloga, pero si se ha visto que, tanto la desensibilización homóloga como la heteróloga, son procesos independientes que ocurren de manera simultánea. (Widmann, y cols., 1996a).

5.- MODIFICACIÓN POSTRANSDUCIONAL. PALMITOILACIÓN

La palmitoilación es una modificación postrasduccional que sufren muchas proteínas implicadas en las rutas de señalización (Casey, 1995; Dumphy, y Linder, 1998) y consiste en la unión de ácidos grasos de 16 átomos de carbono, mediante enlace tioéster, a residuos de cisteína de la proteína (Bonatti, y cols., 1989). Esta modificación es reversible y se sabe que los procesos de señalización de algunos receptores están regulados por ciclos de palmitoilación y depalmitoilación dependiente del agonista (Bouvier, 1995). La mayoría de los receptores acoplados a proteínas G están palmitoilados en el extremo carboxilo terminal cerca de la última región transmembranal, debido a la existencia de cisteínas en esta zona.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la cadena hidrocarbonada del ácido graso, en la mayoría de los GPCRs, se forma un cuarto lazo intracitoplasmático por interacción de esta cadena hidrocarbonada con la membrana plasmática. Este tipo de modificación es característica de muchos miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, como la rodopsina (Ovchinnikov, y cols., 1988), receptores α -2-adrenérgico (Kennedy, y Limbird, 1994), y β -adrenérgico (O'Dowd, y cols., 1989), endotelina B (Okamoto, y cols., 1997), TSH (Tanaka, y cols., 1998) de hormona luteinizante/gonadotropina coriónica (Zhu, y cols., 1995), receptores muscarínicos humanos (Hayashi, y Haga, 1997), vasopresina (Sadeghi, y cols., 1997), dopamina (Jin, y cols., 1999), receptores

metabotrópicos de glutamato (Pickering, y cols., 1995), dopamina tipo 2, serotonina, opioide, y de la endotelina A (Hawtin, y cols., 2001)

Además de los GPCRs otras proteínas que participan en la transducción de señales deben ser palmitoiladas para ser funcionales como es el caso de miembros de la familia de las GRKs, de las PKC y la subunidad α de las proteínas G.

5.1.- Implicación de la palmitoilación en la regulación de efectores y producción de segundos mensajeros

En la actualidad se han observado diversos procesos regulados por esta modificación que pueden cambiar de alguna manera la capacidad de transducción de la señal de un receptor. El papel de la palmitoilación en la producción de segundos mensajeros difiere en los casos estudiados hasta ahora. En algunos casos la deficiencia de palmitoilación no modificó la capacidad para activar proteínas G de receptores como el de arginina-vasopresina (Schulein, y cols., 1996), tirotropina (Tanaka, y cols., 1998) y α 2-adrenérgico (Eason, y cols., 1994). Sin embargo el receptor de endotelina no palmitoilado fue capaz de estimular la adenilato ciclasa pero no la hidrólisis de fosfatidilinositoles y en el caso de los receptores deficientes en palmitoilación de dopamina D1 (Jensen, y cols., 1995) y β -adrenérgico (O'Dowd, y cols., 1989) la estimulación de las proteínas G disminuyó.

En algunos tipos de receptores la ausencia de palmitoilación modifica la accesibilidad de las quinasas a sitios de fosforilación situados en la zona próxima a esta modificación. El incremento de fosforilación produce una disminución de la capacidad de acoplamiento con las proteínas G, como ocurre en el caso del receptor β -adrenérgico (Moffet, y cols., 1993). En algunos receptores se han descrito regulaciones cruzadas entre ambos tipos de modificación covalente: palmitoilación y fosforilación. Así la estimulación prolongada del receptor β -adrenérgico por su agonista provoca la fosforilación del receptor y favorece la depalmitoilación del mismo, permitiendo así una disminución de la señal del receptor (Loisel, y cols., 1996). En el caso del receptor α -adrenérgico, la depalmitoilación no modificó la desensibilización del receptor. (Eason, y cols., 1994). El receptor de la 5-hidroxitriptamina (HT) está normalmente acilado y la interacción dinámica entre la palmitoilación y la fosforilación es importante en la regulación de la desensibilización del receptor promovida por el agonista (Eugeni, y cols., 2001).

5.2.- Papel de la palmitoilación en la endocitosis

Se ha postulado que la palmitoilación podría estar implicada en la asociación de proteínas con complejos enriquecidos en glicoesfingolípidos, que son los precursores de algunas estructuras implicadas en la endocitosis (Parton, y Simons, 1995). Las evidencias del posible efecto que la palmitoilación tiene en el proceso de endocitosis son contradictorias. Estudios realizados por Alvarez, y cols., en 1990, demostraron que, en el caso del receptor de transferrina la acilación por ácido palmítico disminuyó la internación del receptor. En los casos estudiados con GPCRs la mutación de los sitios de acilación produjo resultados diversos, inhibiéndose la endocitosis en el caso de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Nussenzveig, y cols., 1993). Sin embargo aumentó la internación estimulada por sus agonistas en el receptor de la hormona luteinizante y receptores de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) (Kawate y Menon, 1994), pero no se modificó la endocitosis en el caso de los receptores β - y α -adrenérgicos (Eason, y cols., 1994 y Campbell, y cols., 1991).

OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo fue el estudio de la función del extremo carboxilo terminal del receptor de GLP-1 en los mecanismos de transducción de señales e internación mediados por el receptor.

Para ello se han utilizado receptores con deleciones y/o mutaciones puntuales en residuos de este dominio del receptor y se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterización del receptor de GLP-1 expresado en la línea celular CHO estudiando la capacidad de unión al ligando GLP-1(7-36)amida e identificación de los complejos ligando-receptor.

- Análisis de las señales de transducción llevadas a cabo por el receptor de GLP-1, así como los fenómenos de desensibilización tras periodos de exposición al agonista.

- Estudio del proceso endocítico, llevado a cabo por dicho receptor, mediante la determinación y la participación en este proceso de las vesículas recubiertas de clatrina y su capacidad de reciclaje a la membrana celular.

- Identificación de las regiones del extremo carboxilo terminal del receptor de GLP-1, implicadas en la señalización y endocitosis de dicho receptor mediante la deleción o sustitución de varios residuos de este dominio.

- Análisis del papel de la cisteína en posición 438 de la secuencia del receptor de GLP-1 (posible sitio de palmitoilación) en los procesos de señalización y endocitosis.

- Efecto de las deleciones y sustituciones en el extremo carboxilo terminal del receptor de GLP-1, en la fosforilación del receptor por la PKC "in vitro".

- Efecto de la fosforilación de residuos del extremo carboxilo terminal del receptor por las quinasas de segundos mensajeros (PKC y PKA), en el proceso de endocitosis.

*MATERIALES Y
MÉTODOS*

1.- CONSTRUCCIÓN DE LOS DIFERENTES MUTANTES DEL RECEPTOR DE GLP-1

1.1.- Materiales utilizados

Para la obtención de los diferentes mutantes del receptor de GLP-1, se partió de la secuencia del cDNA del receptor de GLP-1 que fue generosamente cedido por Bernard Thorens (Instituto de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Lausanne, Lausanne, Suiza). Los plásmidos utilizados fueron: pUC18 de Clontech Laboratories, (Palo Alto, CA, EEUU), pcDNA.1 de Invitrogen Corporation, pGEM-T-Easy de Promega (Life Science, Madison, EEUU), y el plásmido pSV2-Neo de Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK).

Las cepas bacterianas de *E. coli* utilizadas fueron, BMH71-18 muts, DH5 α , BL21, MC1061/P3. Los medios para el cultivo de dichas bacterias fueron preparados con extracto de levadura, triptona, NaCl, y Agar, todos ellos, exceptuando el NaCl, fueron adquiridos a DIFCO.

Para los experimentos de mutagénesis dirigida se utilizó el "Kit de mutagénesis dirigida" de Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, EEUU). Los oligonucleótidos usados en las reacciones de mutagénesis mediante PCR fueron sintetizados por Roche Diagnostics.

Para el aislamiento de los plásmidos se utilizaron columnas de Quiagen (Hilden, Alemania), y para la extracción de los fragmentos de DNA de los geles de agarosa, se utilizó un "kit de aislamiento" de Biotools S.A. (Madrid, España).

Las enzimas de restricción utilizadas fueron de New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU), MBI Fermentas (Alemania), Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK) y Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

1.2.- Mutagénesis

El cDNA del receptor de GLP-1 de rata (1540 pb) cedido por Bernard Thorens, fue subclonado entre las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Hind*III- *Xba*I, del plásmido pUC18, dando lugar a la construcción pUC18 GLPR-1.

Las modificaciones realizadas en la secuencia del receptor de GLP-1, para la obtención de los mutantes que hemos estudiado en nuestro trabajo, se llevaron a cabo mediante dos métodos de mutagénesis diferentes: mutagénesis dirigida, basado en el método de Deng y Nickoloff (1992), y técnicas de mutagénesis utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.2.1.- Mutagénesis dirigida.

El método utilizado para realizar estas construcciones está basado en una modificación del método de Deng y Nickoloff (1992), de acuerdo con lo que a continuación se describe.

Obtención del mutante pcDNA.1 GLPR A⁴³⁸

Una de las modificaciones realizadas por mutagénesis dirigida, fue la sustitución de la cisteína en posición 438 por alanina. Para ello se hibridaron de manera simultánea dos oligonucleótidos a una de las hebras del plásmido pUC18 GLPR-1 previamente desnaturalizado.

Un oligonucleótido, 5'TGAAACCCCTTAAGGCTCCCACCAGCAGCG 3', introduce la mutación deseada, es decir, el cambio en posición 438 de la cisteína por alanina, además de un nuevo sitio de restricción *Bfr*I (en posición 1322 de la secuencia de nucleótidos). El otro oligonucleótido 5'GAGTGCACCATGGGCGGTGTGAAAT 3', denominado "primer de selección", elimina un único sitio de restricción (*Nde*I) en el vector que se está utilizando, que nos servirá para seleccionarlo.

Se inicia el proceso con la desnaturalización del plásmido (1 pmol de pUC18 GLPR-1) e hibridación de los cebadores (50 pmoles de los oligonucleótidos fosforilados) por incubación a 100°C durante 5 minutos, seguido de una incubación corta a 4°C y otra mas larga a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la síntesis de la cadena complementaria por la elongación con ambos cebadores tras la adición de dNTPs 10 nM, ATP 1mM, 3 U de T₄ DNA polimerasa y 400 U de T₄ DNA ligasa, incubando a 37°C durante 90 minutos en un volumen final de 30 µl. Finalizada la reacción la mezcla se trató con la endonucleasa *Nde*I. La cepa bacteriana de E. Coli (*E. Coli* BMH71/18 muts) que es deficiente en la reparación del DNA fue transformada con el DNA modificado. El DNA plasmídico se aisló mediante lisis alcalina, y se procedió a una segunda selección con *Nde*I. La identificación de clones positivos, se realizó mediante la digestión con las enzimas de restricción (*Nde*I y *Bfr*I), seguida de la electroforesis en geles de agarosa al

1%, para confirmar el tamaño correcto del DNA digerido. Posteriormente esta mutación, Ala⁴³⁸, fue confirmada por secuenciación utilizando el secuenciador automático de Pharmacia LKB ALF DNA. El fragmento *HindIII*-*XbaI* del cDNA mutante se subclonó en un vector de expresión en células eucariotas pcDNA.1, dando lugar a la construcción pcDNA.1 GLPR A⁴³⁸ (Figura 9).

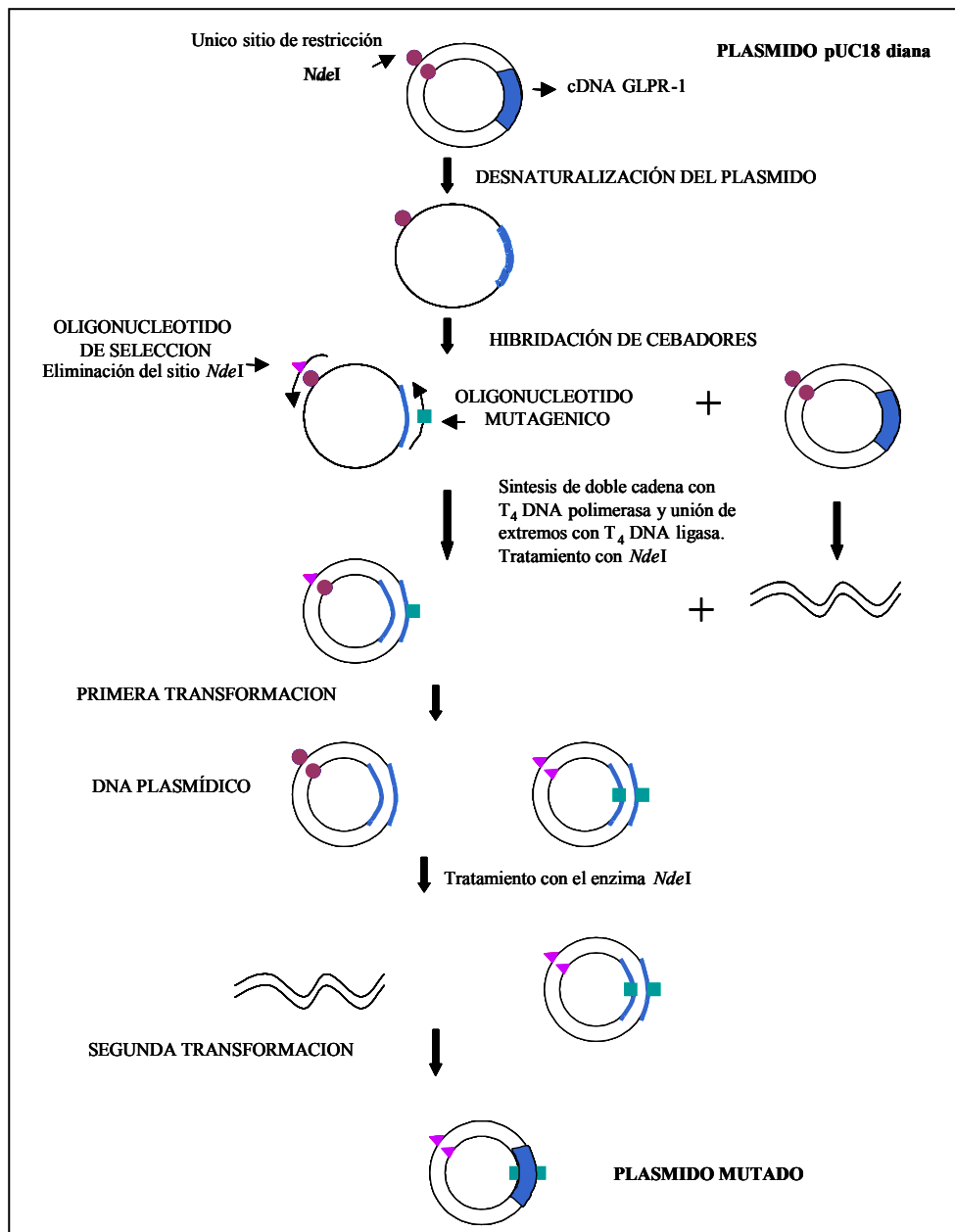


Figura 9.- Esquema representativo del proceso de mutagénesis dirigida para la obtención del mutante pcDNA.1 GLPR A⁴³⁸ siguiendo un método modificado de Deng y Nickoloff (1992).

Obtención de los mutantes pcDNA.1-GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ pcDNA.1 GLPR 435R y pcDNA.1 GLPR 418R.

A partir del mutante pcDNA.1 GLPR A⁴³⁸, se realizaron dos nuevas construcciones. Para eliminar la secuencia del receptor entre los aminoácidos 419 y 435, el pcDNA.1 GLPR A⁴³⁸, se trató con la enzima de restricción *Bfr*I (en posición 1322 de la secuencia de nucleótidos), seguido de un tratamiento con el enzima T₄ DNA polimerasa durante 20 minutos a 12°C, con el fin de generar extremos romos. Posteriormente se cortó el plásmido con el enzima de restricción *Eco*47III (que corta en la posición 1271) y fue tratado con T₄ DNA ligasa. La secuencia correcta se confirmó utilizando el secuenciador automático de Pharmacia, obteniéndose el mutante pcDNA.1-GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ (Figura 10).

Para la eliminación de los residuos a partir del aminoácido en posición del 436 hasta el final de la secuencia del receptor el pcDNA.1 GLPR A⁴³⁸ se trató con los enzimas de restricción *Bfr*I y *Pst*I (que corta en la posición 1403 de la secuencia de nucleótidos del cDNA del receptor de GLP-1). Se procedió a la eliminación de los extremos monocatenarios generados por los enzimas, mediante el tratamiento con el enzima exonucleasa Mung Bean Nucleasa (Amersham Life Science) y finalmente fue tratado con T₄ DNA ligasa. Estos tratamientos produjeron el cambio del aminoácido 436 por arginina dando lugar al mutante pcDNA.1 GLPR 435R (Figura 10). La secuencia se confirmó mediante secuenciación automática.

A partir del pcDNA.1 GLPR-1 (control), se realizó una eliminación desde el residuo 419 de la secuencia del receptor de GLP-1. Para ello se trató con los enzimas de restricción *Eco*47III y *Pst*I. El tratamiento con exonucleasa, nos permitió obtener extremos romos que pudieron ser religados utilizando T₄ DNA ligasa. La secuencia correcta se confirmó mediante secuenciación automática y se obtuvo el mutante pcDNA.1 GLPR 418R (Figura 11).

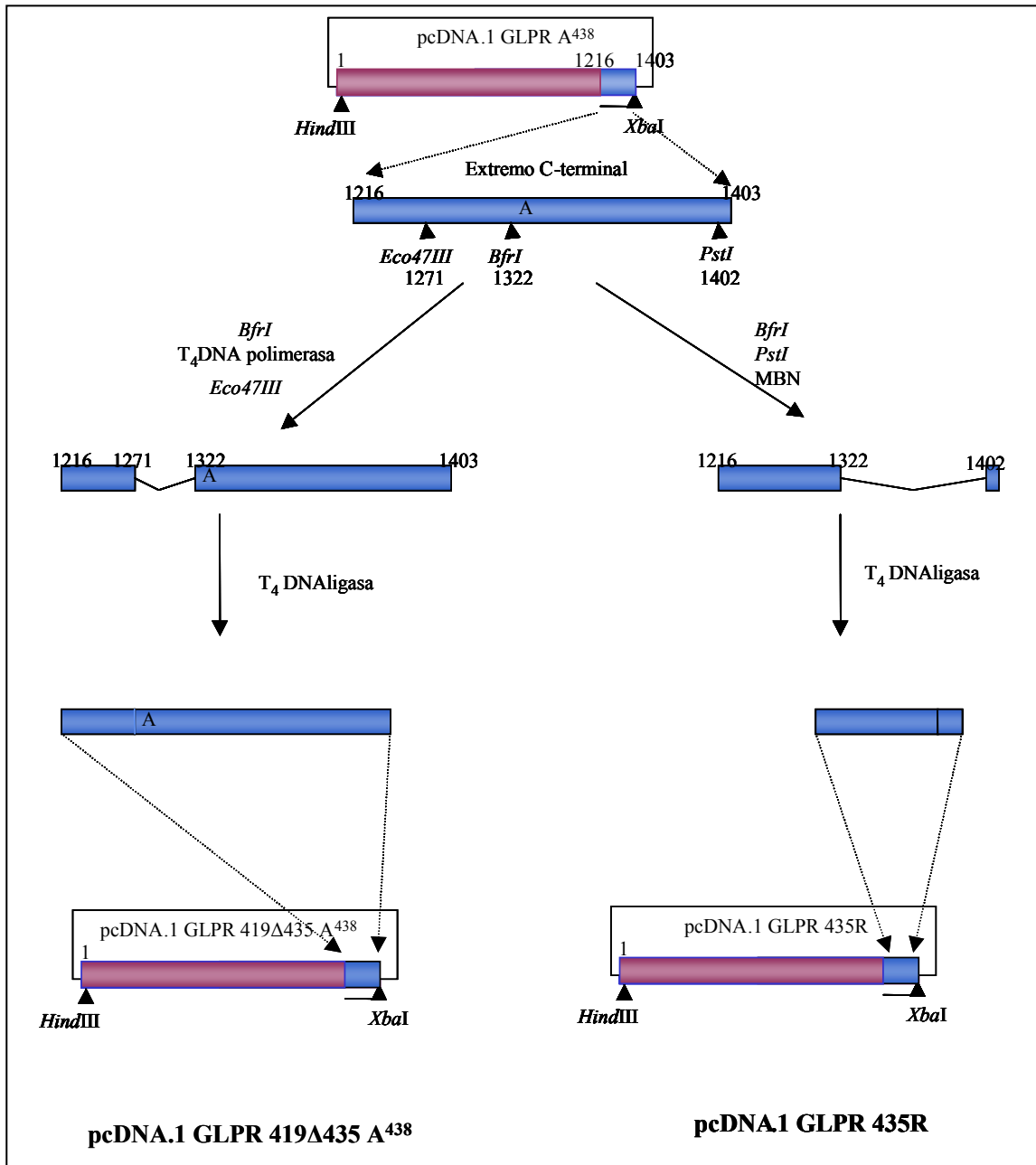


Figura 10.- Esquema representativo de la obtención de los mutantes pcDNA. GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ y pcDNA.1 GLPR 435R.

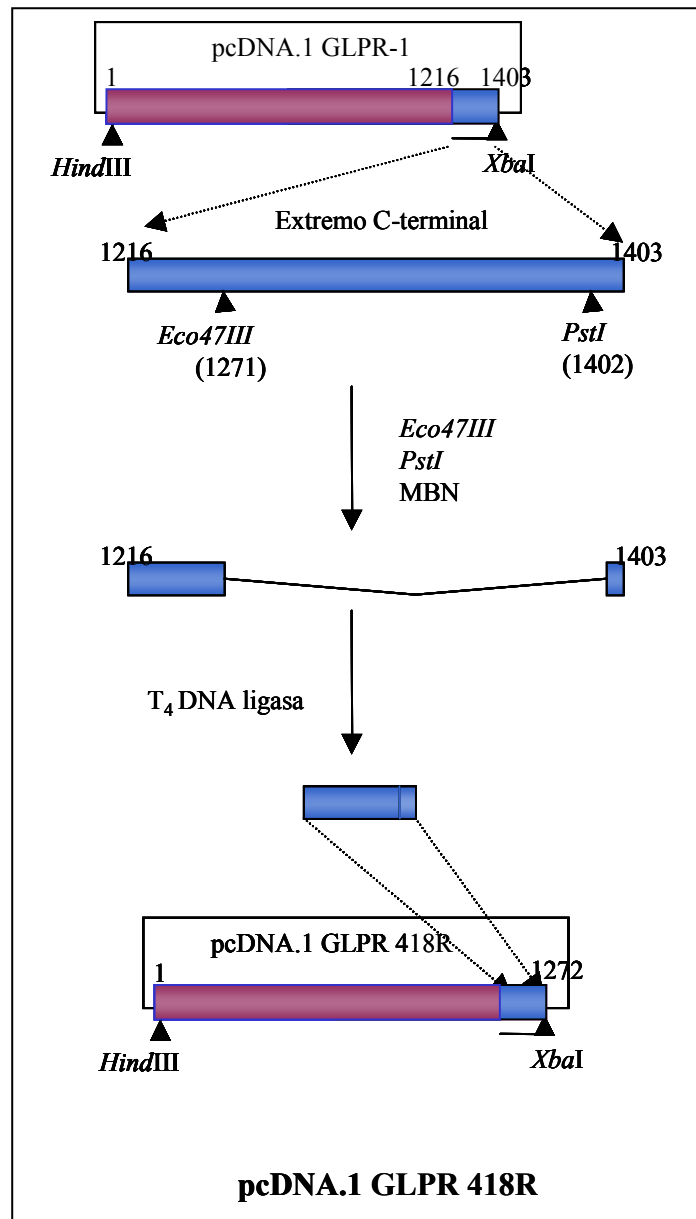


Figura 11.- Esquema representativo para la obtención del mutante del receptor de GLP-1 pcDNA.1 GLPR 418R.

1.2.2.- Obtención de mutantes mediante PCR

Otro procedimiento de mutagénesis fue usado para sustituir por alanina los aminoácidos de la secuencia del receptor de GLP-1 situados en posición 408(E), 409(V), 410(Q) utilizado para ello la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” o PCR. Para realizar las mutaciones se diseñaron dos oligonucleótidos portadores de las mutaciones deseadas

que hibridan en direcciones opuestas a las dos cadenas de la doble hélice (Fig. 12), el GLPR-15 y su complementario el GLPR-16, y otros dos oligonucleótidos que flanquean la secuencia de cDNA que queremos amplificar el GLPR-2 y el GLPR-3. Las secuencias de dichos oligonucleótidos fueron:

GLPR-15: 5'TGTCAACAATGCGGCCGCGATGGAGTTTCG 3'(1227-1259)

GLPR-16: 5'TCCATCGCGGCCGCATTGTTGACAAAG 3'(1225-1256)

GLPR-2: 5'ACCTGCCAAAATTCCTGCAGCAGCTGAGCC 3'(1384-1411)

GLPR-3: 5'GGGTCAACTTCCTTGTCTTCATCCG 3'(969-993)

Se realizaron dos reacciones de PCR independientes. Por un lado se amplificó el fragmento de cDNA del receptor de GLP-1 con los oligonucleótidos GLPR-16 y GLPR-3, y por otro lado se amplificó la secuencia con los oligonucleótidos GLPR-15 y GLPR-2. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, de una mezcla que contenía 0,5 µM de los correspondientes oligonucleótidos, 0,5 µg del pcDNA.1 GLPR-1, dNTP 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 5 mM, 7 % de DMSO y 2,5 unidades de Taq polimerasa. Se realizaron 30 ciclos de PCR cada uno de los cuales consta de tres etapas: una desnaturalización a 96°C durante 40 segundos, una hibridación a 65°C durante 40 segundos y una extensión a 72°C durante dos minutos. La eficacia de amplificación fue verificada mediante electroforesis de 6 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos obtenidos de ambas reacciones se amplificaron con los oligonucleótidos GLPR-3 y GLPR-2, con las mismas condiciones. Los productos de esta reacción fueron subclonados en el vector de clonaje pGEMt-easy. Se comprobó que la secuencia era correcta mediante secuenciación automática. El fragmento obtenido de digerir dicho vector entre los sitios de corte *SacI-PstI* (de 442 pb), fue introducido en el pcDNA.1 GLPR-1, previamente digerido con los mismos enzimas de restricción dando lugar al mutante pcDNA.1 GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ (Figura 12).

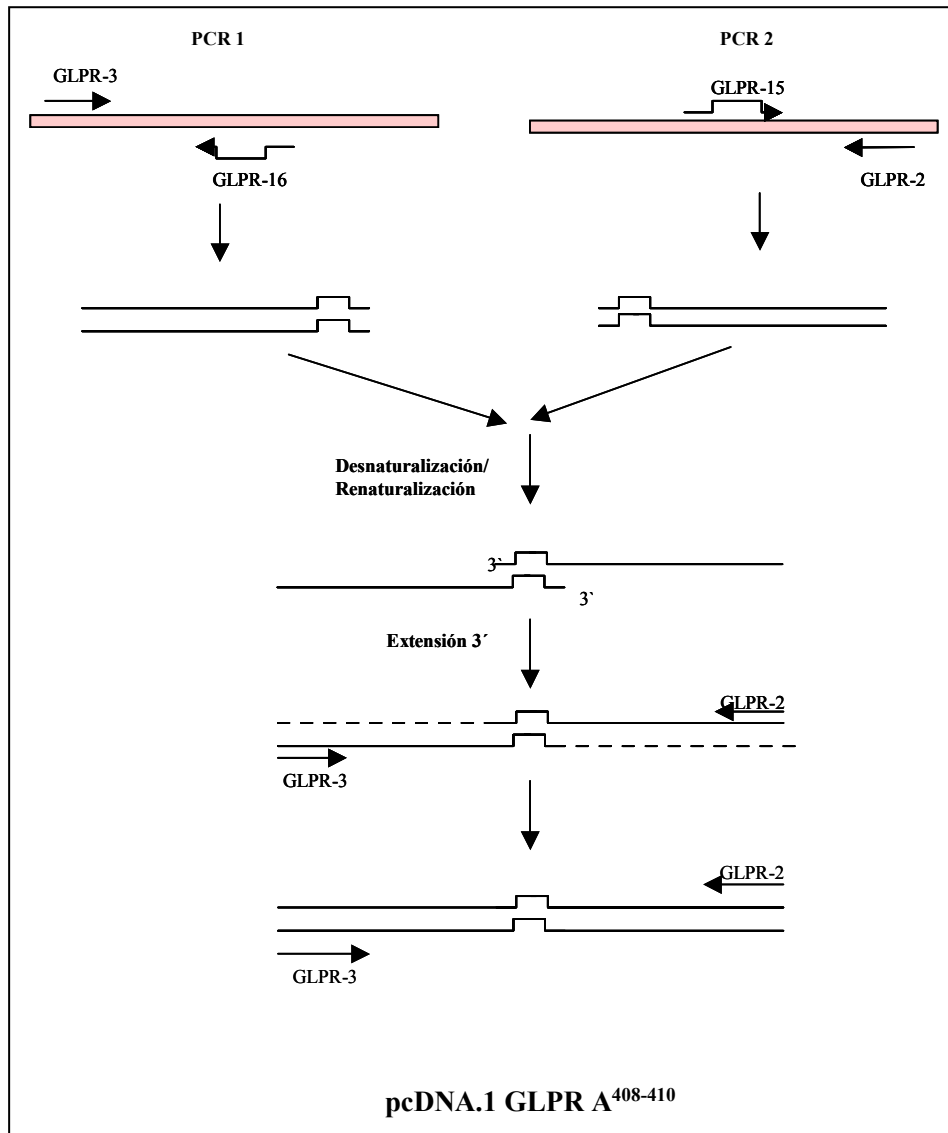


Figura 12.- Esquema representativo del proceso de mutagénesis mediante técnicas de PCR seguido, para la obtención del mutante del receptor de GLP-1 pcDNA.1 GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰.

Paralelamente se realizó otra construcción común a todos los mutantes; introduciendo del epítipo tag (DYKDDDBDK) en el extremo N-terminal de la secuencia del receptor en el sitio *NcoI* de la secuencia del receptor de GLP-1.

Los receptores con la secuencia tag se prepararon ligando los oligonucleótidos sintéticos: 5'CATGGACTACAAGGACGATGACGACAAG 3' y su complementario 5'CTTGTCGTCATCGTCCTTGTCTTGTAGTC 3', en el sitio *NcoI* del receptor de GLP-1. Tras el tratamiento con exonucleasa se religó con T₄ DNA ligasa. Después se comprobó mediante secuenciación que la inserción había sido correcta.

El fragmento tag se introdujo en todas las construcciones realizadas, obteniéndose el pcDNA.1 tag GLPR-1, tag GLPR A⁴³⁸, tag GLPR 419Δ435 A⁴³⁸, tag GLPR 418R, tag

GLPR 435R y tag GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰. Este epítopo nos permitió inmunoprecipitar los receptores de GLP-1 con el anticuerpo monoclonal anti FLAG-M2.

2.- TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON LOS DIFERENTES MUTANTES DEL RECEPTOR

Con objeto de estudiar el efecto de las mutaciones introducidas en el receptor sobre el proceso de señalización, estos receptores se expresaron en dos líneas celulares diferentes. Estas fueron las células CHO, que proceden del ovario de hamster chino, y que no expresan receptores de GLP-1, pero permiten la expresión estable de los diferentes receptores de GLP-1 así como su caracterización, y las células COS-7 que proceden del riñón de mono, utilizadas frecuentemente para expresar concentraciones elevadas de una proteína de forma transitoria, lo que nos permitió estudiar algunos procesos en un periodo de tiempo de 1-4 días después de la transfección.

2.1.- Materiales utilizados en los cultivos celulares

El material fungible utilizado en los cultivos celulares fue adquirido a Nunc y Biotech (Roskilde, Dinamarca).

Los medios de cultivo, Dulbecco modificado Eagle medium (DMEM), y Nutrient Mixture F-12 (Ham's F-12), así como los medios especiales utilizados en marcajes radiactivos (sin metionina, o sin fosfatos en cada caso), fueron de Gibco (Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Los antibióticos penicilina/estreptomicina, el suero bovino fetal (FBS) y la glutamina fueron de Biomedica (Boussens, Francia).

La geneticina (G418) antibiótico de selección, utilizado en las transfecciones de tipo estable fue de Gibco, (Life Technologies). El DEAE-dextrano utilizado en las transfecciones con expresión transitoria fue de Pharmacia Biotech, el dimetilsulfóxido (DMSO), y la cloroquina fueron de Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EEUU).

2.2.- Obtención de líneas celulares estables que expresan receptores de GLP-1 control y mutantes.

Con las células CHO, se utilizó el método de transfección por precipitación con fosfato cálcico (Sege, y cols., 1984). Este método se basa en la captación por parte de las células del DNA precipitado con fosfato de calcio. Las células absorben una pequeña cantidad de DNA y lo integran de forma estable en el DNA cromosómico. La formación del precipitado de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y DNA, se realizó por la adición de Cl_2Ca 1,25 M a una mezcla de reacción que contenía HBS pH 7,05 (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 6,7 mM, glucosa 6 mM, y HEPES 21 mM) y DNA (10 μg del plásmido con el DNA específico en cada caso y 1 μg del plásmido de selección pSV2-Neo, que tiene resistencia a geneticina (G418))

El procedimiento seguido se describe a continuación:

Las células CHO se cultivaron con medio completo Nutrient Mixture F-12 (Ham's) (Gibco) suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS) (Biomedica) y con un 1% de la mezcla de antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a 37°C y en atmósfera con 5% de CO_2 . La cotransfección se realizó con los dos plásmidos antes indicados. Para ello se aspiró el medio de cultivo y a continuación se añadió la mezcla de reacción, de manera que el precipitado estuvo en contacto con las células 20 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió medio completo y tras 17 horas a 37°C se lavaron las células con PBS pH 7,4 (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM), para eliminar los restos de precipitados que pudieran interferir en el crecimiento celular. Las células se mantuvieron en medio selectivo con 400 mg/L de geneticina G418, hasta la obtención de clones resistentes a este antibiótico, que fueron aislados utilizando cilindros de clonaje.

2.3.- Obtención de líneas celulares con expresión transitoria de receptores GLP-1 control y mutantes.

La expresión transitoria de los diferentes receptores se realizó en células COS-7, utilizando el método de transfección con DEAE-dextrano (Lopata, y cols., 1984). Este método se basa en la asociación del DNA al DEAE-dextrano, que es un polícatión de cadena larga con afinidad por el DNA. Estos complejos pueden unirse estrechamente a la

membrana y ser captados por las células. Este proceso es favorecido mediante choque osmótico como es el producido por el efecto del glicerol.

Las células COS-7 se cultivaron en medio completo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de FBS, y 1% de la mezcla de antibióticos estreptomicina-penicilina, para obtener una densidad celular del 30-50% el día de la transfección. Tras retirar el medio de cultivo y lavar con tampón Tris salino (TBS) (Tris HCl pH 7,4 12,5 mM, NaCl 68,5 mM, KCl 2,5 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, CaCl₂ 0,35 mM, MgCl₂ 0,25 mM), se añadió gota a gota la mezcla que contenía el DNA específico (13 µg) y 10 mg/ml de DEAE-dextrano en TBS. La mezcla se distribuyó homogéneamente sobre las células y se mantuvo durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se aspiró la solución y se añadieron 20 ml de DMEM, con 10% de FBS, 20 mM de HEPES y 0,1 mM de cloroquina, incubándose 3 horas a 37°C. Finalmente las células se lavaron con TBS, realizándose un choque osmótico, con una mezcla de DMEM y 20% de glicerol, dejándola actuar durante 4 minutos a temperatura ambiente. A continuación las células se lavaron y se dejaron en medio completo. Transcurridos 3 días se realizaron los experimentos, previo cálculo de la eficiencia de la transfección, mediante el ensayo de unión del GLP-1(7-36)amida marcado radiactivamente a su receptor, que se detallará mas adelante.

3.- CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES

3.1.- Materiales utilizados

El péptido GLP-1(7-36)amida fue de Península Laboratories, (Inc, Belmont, CA, EEUU). El [¹²⁵I]-Na, fue adquirido a American Radiolabeled, Chemicals Inc., (ARC, St. Louis, MO, EEUU). El [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida, se purificó mediante HPLC, utilizando una columna µBondapak C18 de Waters (Flintshire, U.K.). Los productos químicos utilizados para la purificación, como metanol, ácido trifluoracético y acetonitrilo fueron de Scharlau (Barcelona, España).

Todos los demás reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico, y se adquirieron a Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Alemania) y Panreac, (Barcelona, España), así como de USB (Reino Unido).

Para los experimentos de "cross-linking" se utilizó el disuccinimidil suberato (DSS) de Sigma. Los reactivos utilizados para la electroforesis, acrilamida, bis-acrilamida, y persulfato amónico fueron de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, EEUU).

3.2.- Marcaje de GLP-1(7-36) amida con [¹²⁵I]

El GLP-1(7-36) amida se marcó radiactivamente con [¹²⁵I]-Na, según la técnica descrita por Hunter y Greenwood en 1962. Se utilizaron 60 µl de una mezcla de reacción que contenía 0,01 mg de GLP-1(7-36)amida y 2 mCi de [¹²⁵I]-Na en 50 µl de tampón fosfato 0,3 M pH 7,4 que se trataron con 500 ng de Cloramina T (Sigma Aldrich). Tras 30 segundos de agitación a temperatura ambiente, se determinó el porcentaje de incorporación por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 20% de una parte alícuota del vial de marcaje. Cuando la incorporación de [¹²⁵I] al péptido fue superior al 70% se paró la reacción de marcaje añadiendo 0,3 mg de Na₂S₂O₅ y 0,3 mg de IK, diluidos previamente en tampón fosfato 0,3 M pH 7,4 y 0,5% de albúmina bovina (BSA)

La purificación del [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida, se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna µBondapak C18. La fase acuosa utilizada fue 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua, a pH 2,5 ajustado con dietilamina. La fase orgánica fue acetonitrilo con TFA al 0,1 %.

Una vez inyectada la muestra, se eluyó en un gradiente de acetonitrilo desde el 28 % al 49 % durante 40 minutos a un flujo de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se contaron alícuotas de 5 µl en un contador γ (Beckmann) hasta identificar la fracción con el péptido marcado. La fracción con el péptido marcado radiactivamente, se diluyó hasta un volumen final de 1 ml con BSA al 1%, previa eliminación del acetonitrilo residual. Las muestras obtenidas se distribuyeron en alícuotas, congelándose a continuación a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.3.- Análisis del [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido a los receptores de GLP-1 en la superficie celular de células CHO transfectadas e identificación de los complejos ligando -receptor

3.3.1.- Ensayos de Unión

Los ensayos de unión se realizaron en células CHO sembradas en placas de 24 pocillos y cultivadas en medio F-12 completo con 5 % de FBS y 1% de la mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina, con una densidad de 5x10⁴ células/pocillo. Las células se lavaron 3 veces con medio sin suero y se incubaron durante 30 minutos a 37°C

en medio Krebs Ringer HEPES (KRH) pH 7,4 (NaCl 118 mM, KCl 5 mM, SO₄Mg.7H₂O 1,2 mM, CaCl₂.2H₂O 2.5 mM, HEPES 25 mM y KPO₄H₂ 1,2 mM) con 0,5% de BSA y 0,5 mg/ml de bacitracina. Transcurrido este tiempo, las células fueron enfriadas rápidamente a 4°C y se incubaron con [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida 0,1 nM en ausencia o en presencia de 500 nM de GLP-1(7-36)amida sin marcar a temperaturas de 25°C o 4°C. Después del periodo de incubación (0, 15, 30, 60, 90, y 120 minutos), las células se lavaron 3 veces con KRH pH 7,4, 0,5% BSA y 0,01% Tween-20 a 4°C y se solubilizaron por la adición de NaOH 1M. La cantidad de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido se determinó mediante conteo de la radiactividad en un contador γ (Beckmann). La unión inespecífica se cuantificó como la incorporación de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida en presencia de 500 nM del péptido GLP-1(7-36)amida no marcado.

Una vez determinado el perfil de asociación se realizaron estudios de desplazamiento mediante la utilización de concentraciones crecientes del péptido no radiactivo (0, 0,04, 0,2, 1, 5, 10, 25, 100, 200 y 500 nM) durante 16 horas a 4°C.

3.3.2.- Identificación de los complejos [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida-receptor "cross-linking"

Con objeto de identificar los complejos ligando-receptor, tras el período de incubación con [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida las células se lavaron con KRH 0,5% de BSA, y seguidamente con KRH, realizándose la reacción de "cross-linking" utilizando disuccinimidil suberato (DSS) 0,5 mM en KRH, pH 7,4 a 4°C durante 15 minutos. La reacción se paró mediante la adición de Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 7,4. Tras eliminar la mezcla de reacción, las células se lisaron en el tampón de Laemmli (SDS 2,5%, Tris-HCl 5 M pH 6,8, glicerol 2,5%, y azul de bromofenol 0,01%) con 50 mM de DTT. Las muestras se calentaron a 100°C durante 3 minutos, antes de someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida, con dodecilsulfato sódico (SDS) (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli en 1970. Se utilizaron geles de tipo discontinuo, con 9 % de acrilamida para el gel de desarrollo y 4,5 % para el concentrante. Tras la electroforesis, el gel se tiñó con azul comassie 0,005 % en una mezcla de ácido acético:metanol:agua (7:25:68) y se decoloró con ácido acético, metanol y agua (7:5:88). Después de secar el gel se expuso a una película fotográfica (Kónica Corporation, Japón) a -80°C, durante 3 días.

4.- TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

4.1.- Materiales utilizados

Los reactivos utilizados, para el aislamiento del [³H]-AMPc, fueron resina Dowex AG 50Wx4 de Bio-Rad (Richmond, CA, EEUU) y alúmina de Merck (Darmstadt, Alemania). El líquido de centelleo fue de ICN Pharmaceuticals (CA, EEUU) y la [³H]-Adenina, de Dupont-NEN, Life Science Products, Inc. (Boston, MA, EEUU). La forskolina, fue de Amersham. La isobutilmetil-xatina (IBMX), fue adquirida en Sigma Aldrich.

Para la técnica de inmunotransferencia ("Western blot") se utilizaron, acrilamida, bis-acrilamida, persulfato amónico, productos de Bio-Rad Laboratories así como el "kit DC Protein Assay" usado para medir proteínas en presencia de detergentes.

El anticuerpo policlonal anti fosfo ERK fue de New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU) y el anticuerpo anti IgG unido a peroxidasa de rábano (anti IgG-HRP) fue de Amersham Pharmacia Biotech. Los reactivos de inmunodetección por quimioluminiscencia (ECL) fueron de Amersham, así como la membrana de nitrocelulosa.

4.2.- Actividad de la Adenilato ciclasa

Para la medir estimulación de la adenilato ciclasa como consecuencia de la unión del ligando a su receptor control o mutado, se utilizó el método descrito por Farndale y cols., en 1987 y Salomon, 1991. Este método consiste en el marcaje de las células que expresan receptores control o mutados con [³H]-adenina generando [³H]-ATP. El tratamiento de estas células con GLP-1(7-36)amida dará lugar a la estimulación de la adenilato ciclasa que cataliza la síntesis de [³H]-AMPc. Este se separó mediante cromatografía de intercambio iónico del [³H]-ATP y otros posibles derivados metabólicos. Para ello se utilizan secuencialmente dos columnas de intercambio iónico; en la primera la fase estacionaria fue Dowex AG 50Wx4 reconstituida en medio ácido, en la que el [³H]-AMPc se adsorbe a la fase estacionaria, permitiendo así que se vaya separando de [³H]-adenina y otros productos tritiados, mediante una serie de lavados y a continuación se utilizó una columna de alúmina que es capaz de adsorber específicamente el [³H]-AMPc. Finalmente el [³H]-AMPc se eluyó con imidazol 0,3 M.

Las células CHO transfectadas con los receptores de GLP-1 control y receptores modificados se sembraron en placas de 6 pocillos hasta una densidad de 2×10^5 y se

mantuvieron en medio completo Ham's F-12 a 37°C, hasta su confluencia. Dichas células se incubaron con 2 μ Ci de [³H]-adenina en medio F-12 que contenía 0,1% de BSA, durante 5 horas a 37°C. A continuación se lavaron con medio HBS (NaCl 130 mM, NaH₂PO₄ 0,9 mM, MgSO₄ 0,8 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, HEPES 20 mM a pH 7,4, glucosa 25 mM) y se incubaron en presencia o en ausencia de GLP-1(7-36)amida 10 nM durante 15 minutos a 37°C en HBS que contenía el inhibidor de fosfodiesterasas, isobutil-metil-xantina (IBMX) 1 mM y BSA 0,1%. Posteriormente, se lavaron con HBS y se trataron durante 15 minutos con diferentes concentraciones de GLP-1 (0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) en HBS que contenía IBMX 1 mM y BSA 0,1%. Finalmente las células se lisaron en TCA al 5 % con 0,1 mM de AMPc y 0,1 mM de ATP durante 30 minutos a 4°C. Los lisados celulares se centrifugaron a 960 g durante 5 minutos y se determinó la cantidad de [³H]-AMPc en el sobrenadante, utilizando las columnas de intercambio iónico antes descritas. El perfil de elución de ambas columnas se determinó previamente con una cantidad conocida de [³H]-AMPc.

El sobrenadante resultante de la centrifugación de los lisados celulares, se pasó por la columna de Dowex, preparada con HCl 1N y estabilizada con 15 ml de agua. Se realizó el montaje de la columna de Dowex sobre la de alumina, que fue previamente equilibrada con 10 ml de 0,3 M de imidazol pH 7,4, lavándose ambas con 6 ml de agua. Posteriormente el [³H]-AMPc fué eluído de la columna de alúmina con imidazol 0,3 M pH 7,4 y recogido en un vial, donde se añade líquido de centelleo con el fin de contar la radiactividad obtenida.

4.3.- Detección mediante inmunotransferencia de las formas fosforiladas de las quinasas reguladas extracelularmente (ERK1/ERK2).

Las líneas celulares CHO que expresan el receptor control y los receptores modificados mediante mutagénesis fueron cultivadas hasta confluencia en placas de 6 pocillos, con medio completo Ham's F-12 y 5% de suero bovino fetal. Las células fueron ayunadas durante 12 horas y para ello el medio completo se retiró y se incubaron con medio Ham's F-12 que contenía FBS a una concentración final de 0,2 %. A continuación se incubaron en ausencia o presencia de GLP-1 10 nM durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 30, 60, 120 minutos). Posteriormente se lavaron dos veces con PBS a 4°C y se lisaron en tampón que contenía HEPES 25 mM pH 7,4, Triton X-100 1 %, desoxicolato, 1 %, 48

SDS 0,1 %, EDTA 5 mM, NaCl 500 mM, NaF 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM, ortovanadato 1 mM, leupeptina 10 μ M y PMSF 1 mM.

Los lisados fueron centrifugados a 960 g durante 5 minutos a 4°C y se midió la concentración de proteína del sobrenadante mediante una modificación del método descrito inicialmente por Lowry (1951). Para ello se utilizó el "kit" comercial "DC Protein Assay" (Bio-Rad) que permite valorar la concentración de proteínas en muestras solubilizadas con tampones que contienen detergentes.

Cantidades iguales de proteínas (50 μ g) de los diferentes lisados celulares se separaron mediante electroforesis desnaturante en gel discontinuo de poliacrilamida al 9% en presencia de SDS (PAGE-SDS) según el método descrito por Laemmli, en 1970. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un tampón de transferencia (glicina 250 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1 % y 20 % de metanol), durante 4 horas a 250 mA (Towbin, y cols., 1979). Para verificar la eficacia de la transferencia y la igualdad en la cantidad de proteína cargada, se tiñó la membrana con el colorante rojo Ponceau. Tras lavar la membrana con el tampón de lavado, NaCl 137 mM, Tris 20 mM pH 7,4 (TBS) y 0,1 %, Tween-20, se incubó a 4°C durante 16 horas en la solución de bloqueo (TBS con 5% de leche desnatada en polvo y 0,1% de Tween-20). Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal anti fosfo-Erk de conejo, a una dilución 1:1.000 en TBS con 2 % de leche desnatada en polvo y 0,1 % de Tween-20, durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar el exceso de anticuerpo, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo unido a peroxidasa (anti-rabbit IgG) a una dilución 1:3.000 en TBS con 2% de leche y 0,1% de Tween-20, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras nuevos lavados las bandas inmunoreactivas se visualizaron usando el kit de detección ECL de Amersham y las membranas fueron expuestas con películas autorradiográficas Kónica, y la señal obtenida cuantificada por densitometría.

5.- ENDOCITOSIS Y REDISTRIBUCIÓN

5.1.- Medida de la internación del receptor de GLP-1

La constante de primer orden del rango de endocitosis para la internación del receptor de GLP-1 fue medida utilizando el método de IN/SUR de Wiley y Cunningham (1982). El método permite la medida del grado de acumulación intracelular del ligando bajo unas condiciones en las que el número de receptores ocupados en la superficie celular es constante y no se produce la liberación del ligando acumulado.

Dicho método permite definir la constante aparente de primer orden como “la probabilidad de que un receptor de membrana unido a su ligando sea internalizado en un minuto a 37°C”. Podemos calcular la relación entre el ligando internalizado y el ligando unido a la superficie celular en función del tiempo. La cantidad de ligando unido intracelularmente se determina después del tratamiento de las células con un tampón ácido a pH 3, que origina la disociación del ligando unido a la superficie. Consecuentemente se determina el ligando unido en la superficie como la diferencia entre la unión total y la unión intracelular.

Las células CHO transfectadas con los receptores de GLP-1 control y mutantes fueron sembradas en placas de 24 pocillos. Se lavaron con KRH a pH 7,4, 0,5% BSA y se incubaron seguidamente en este mismo medio durante 30 minutos a 37°C. A continuación se incubaron con [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida 0,1 nM durante 2, 4, 6, 8, 10 y 12 minutos a 37°C y fueron rápidamente enfriadas a 4°C. Posteriormente se lavaron con KRH, 0,5% de BSA y 0,01% de Tween-20 a 4°C, tratándose después con o sin tampón ácido (NaCl 50 mM, de glicina 150 mM a pH 3) durante 3 minutos a 4°C. Esto provoca la eliminación del ligando unido a los receptores que se encuentran en la superficie celular. Tras este tratamiento podemos determinar la cantidad de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido intracelularmente. La unión del [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida a su receptor en la superficie celular fue calculada por la diferencia entre la unión total y el [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido intracelularmente. También se realizaron experimentos en paralelo en presencia de los inhibidores RO-318820 10 μM, un inhibidor selectivo y específico de la proteína quinasa C (PKC), y H-89 10 μM, que es un inhibidor selectivo de PKA.

Se comprobó también el efecto sobre la tasa de endocitosis, tras el tratamiento con medio hipertónico utilizando sacarosa 0,45 M, y el tratamiento con inhibidores metabólicos como la D-desoxiglucosa y la azida sódica. Para ello las células CHO transfectadas con los diferentes receptores de GLP-1, se sembraron en placas de 24 pocillos hasta una densidad de 5×10^4 células por pocillo. Para el tratamiento hipertónico, se lavaron 3 veces con un medio que contenía NaCl 140 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ClK 10 mM y 1 mg/ml de glucosa además de 0,5% de BSA. Posteriormente se incubaron en este mismo medio que contenía además sacarosa 0,45 M durante 30 minutos a 37°C. Una vez eliminado el medio de incubación, las células fueron incubadas con [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida 0,1 nM en el medio con sacarosa 0,45 M y con 0,5 mg/ml de bacitracina durante 6 minutos, transcurridos los cuales fueron tratadas con o sin tampón ácido según lo descrito anteriormente.

El tratamiento de las células con los inhibidores metabólicos permite la eliminación de los procesos de endocitosis dependientes de energía. Para ello dichas células se incubaron durante 30 minutos con un medio que contenía NaCl 140 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ClK 10 mM y desoxiglucosa 20 mM y 10 mM de azida sódica, y 0,5% de BSA. Posteriormente se incubaron con [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida 0,1 nM, en este mismo medio durante 6 minutos a 37°C, transcurridos los cuales las células se lavaron a 4°C con KRH 0,5% BSA y 0,01% Tween-20, y se incubaron en medio ácido para eliminar el péptido unido en la superficie celular y por diferencia entre la unión total y la unión intracelular pudimos determinar la tasa de endocitosis según lo descrito por Wiley y Cunningham (1982).

5.2.- Efecto del GLP-1(7-36)amida sobre el número de receptores de GLP-1 en la superficie celular. Ensayos de redistribución

Para analizar el efecto de GLP-1(7-36)amida sobre la expresión de sus receptores en la superficie celular, las líneas celulares obtenidas tras la transfección estable con el receptor de GLP-1 y los receptores modificados mediante mutagénesis, se sembraron en placas de 24 pocillos y se mantuvieron creciendo en medio completo hasta su confluencia. Estas células fueron incubadas a 37°C con GLP-1(7-36)amida 10 nM en KRH pH 7,4, con 0,5 %BSA y 0,5 mg/ml de bacitracina durante diferentes tiempos (3, 6, 10, 15, 30 y 60 min). Posteriormente se enfriaron a 4°C y se lavaron con KRH pH 7,4 , 0,5% BSA dos veces en frío. Seguidamente el péptido unido a receptores en la membrana celular se disoció por tratamiento con tampón ácido a pH 3.0, durante 3 minutos, y tras lavar con KRH pH 7,4 y 0,5% BSA frío, se determinó el número de receptores localizados en la membrana celular incubando con [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida 0,1 nM a 4°C durante 16 horas. Las células se lavaron 3 veces con KRH a pH 7.4, 0.5% BSA y 0.01% Tween-20 a 4°C y se solubilizaron por la adición de NaOH 1M. La unión de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida se determinó mediante contaje en un contador γ de la radiactividad incorporada. Se cuantificó la unión inespecífica como la incorporación de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida en presencia de 500 nM del péptido GLP-1(7-36)amida no marcado.

6.- FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR

Se analizó la fosforilación del receptor de GLP-1 nativo y mutantes mediante quinasas intracelulares (en los experimentos “*in vivo*”) y la fosforilación del extremo carboxilo terminal del receptor de GLP-1 y mutantes por PKC en un sistema “*in vitro*” mediante la utilización de proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST).

6.1.- Materiales utilizados

Para realizar los experimentos de inmunoprecipitación se utilizó el anticuerpo monoclonal biotinilado anti Flag Bio M2 de Sigma Aldrich. La matriz de Estreptavidina-Agarosa fué también de Sigma. El [³²P] y el [³²γP]-ATP fueron adquiridos a American Radiolabeled, Chemicals, Inc., (ARC, St. Louis, MO, EEUU).

Como inhibidores de proteasas se utilizaron el fluoruro de metilfenilsulfonio (PMSF) y leupeptina. Como inhibidores de fosfatasas se utilizó ortovanadato sódico de Alexis (San Diego, EEUU), pirofosfato sódico y fluoruro sódico ambos de Merck.

Como sustancias activadoras de los procesos de fosforilación se utilizaron L-fosfatidil L-serina de Sigma y dioctanoilglicerol de Alexis.

El plásmido utilizado para la obtención de las proteínas de fusión fue pGEX.5X-2 de Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK). La glutatión agarosa, y el glutatión fueron de Sigma.

La proteína quinasa C de cerebro de rata, utilizada en los ensayos de fosforilación “*in vitro*” fue adquirida a Calbiochem (San Diego, CA, EEUU). Como inhbidor de la proteína quinasa C se utilizó RO-318220 y como inhibidor de la proteína quinasa A, H-89, ambos de Alexis.

6.2.- Fosforilación “*in vivo*”. Inmunoprecipitación

Para los ensayos de fosforilación *in vivo* se utilizó la línea celular COS-7 transfectada de manera transitoria (ver apartado de transfección celular) con los receptores de GLP-1 y mutantes que tienen en su secuencia el epítipo “tag”. Dichas células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y mantenidas en medio Eagle modificado

por Dulbecco, suplementado con FBS 10%, hasta confluencia. Posteriormente se incubaron en medio sin fosfato y con 0,2 mCi/ml de [³²P], durante 2 horas. Transcurrido dicho periodo de tiempo se procedió a su incubación con o sin GLP-1(7-36)amida 10 nM durante 15 minutos y con o sin el inhibidor de la PKC durante 30 minutos. A continuación las células se lavaron con PBS a 4°C y se añadieron 500 µl del tampón de lisis (HEPES 25 mM a pH 7,4, Triton X-100 1 %, desoxicolato 1 %, SDS 0,1 %, EDTA 5 mM, NaCl 500 mM, NaF 50 mM, pirofosfato 5 mM, ortovanadato 1 mM, leupeptina 10 µM y PMSF 1 mM). Los lisados celulares se centrifugaron durante 30 minutos a 20800 g a 4°C, y el sobrenadante se incubó con agarosa-estreptavidina a temperatura ambiente, durante 1 hora con el fin de eliminar unión inespecífica. Estas muestras se centrifugaron a 980 g 5 minutos y el sobrenadante se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 10 µg/ml del anticuerpo biotinilado Anti Flag Bio M2, unido previamente a 50 µl de agarosa-estreptavidina. Los inmunoprecipitados se lavaron dos veces con el tampón de lisis y se sometieron a electroforesis en gel de SDS-acrilamida. Después de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con el fin de reducir el fondo producido por el fosfato libre. Las membranas se expusieron con una película autorradiográfica que fue revelada después de la exposición durante 2 días a -80°C.

6.3.- Fosforilación del extremo C-terminal del receptor de GLP-1 por la proteína quinasa C

Se realizaron ensayos de fosforilación “*in vitro*” para analizar si el extremo carboxilo terminal de los receptores de GLP-1, control y mutantes son sustratos de la proteína quinasa C (PKC).

6.3.1.- Obtención de las proteínas de fusión

Se obtuvieron proteínas de fusión del extremo carboxilo terminal del receptor de GLP-1 y mutantes con la glutatión-S-transferasa (GST). Para ello la secuencia del extremo carboxilo terminal del receptor de GLP-1 (aminoácidos 406-463) delimitada entre las enzimas de restricción *HincII* y *XhoI*, se ligó en el vector pGEX.5X.2 digerido previamente con *SmaI* y *XhoI*. Este vector permite la síntesis de cadenas polipeptídicas en la cepa bacteriana *E. coli* por la fusión con el extremo C-terminal de una glutatión-S-transferasa codificada por el parásito *Schistosoma japonicum*. La proteína unida a GST

interacciona con la glutatión-agarosa y el glutatión compite con la proteína unida a GST liberándola de la matriz.

La expresión y purificación de las proteínas de fusión se realizaron en la cepa de *E.coli* BL21, tras la transformación de dicha cepa bacteriana con los plásmidos que contienen las secuencias del receptor a estudiar. Estas bacterias se crecieron toda la noche en un medio de cultivo 2TY con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C en agitación. Tras su crecimiento se realizó una dilución 1/10 del cultivo bacteriano y se incubó durante 90 minutos a 37°C. Seguidamente, para inducir la expresión de las proteínas de fusión, se añadió al medio de cultivo isopropil-β-D-tiogalactosido (IPTG) 0,1 mM durante 4-5 horas a 37°C. El crecimiento bacteriano se detuvo por incubación en hielo, y se centrifugó durante 15 minutos a 960 g a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en un tampón que contenía Tris 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM (con 20 µg/ml DNAsa) y Triton X-100 1%. Transcurridos 10 minutos de agitación a 4°C con este tampón, las muestras fueron sonicadas durante 30 segundos. Posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 20800 g a 4°C. El sobrenadante se incubó 2 veces con 100 µl de glutatión-agarosa al 50% en PBS durante 15 minutos a 4°C. El precipitado resultante de la centrifugación a 20800 g se lavó 2 veces con 10 ml de un tampón que contenía Tris 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y NP-40 0,5%. Por último se procedió a la elución de las proteínas unidas a GST con 100 µl de Tris 100 mM pH 8, NaCl 120 mM y glutatión 20 mM. Se midió la cantidad de proteína obtenida y se visualizó por electroforesis en geles de SDS-acrilamida al 9%. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su utilización.

Las proteínas obtenidas se denominaron como GST, GST-GLPR(406-463), GST-GLPR(406-463A⁴³⁸), GST-GLPR(406-419Δ435A⁴³⁸), GST-GLPR(406-435R) y GST-GLPR(406-418R).

6.3.2.- Ensayo de fosforilacion por proteína quinasa C (PKC)

Las proteínas de fusión antes definidas (GST, GST-GLPR(406-463), GST-GLPR(406-463A⁴³⁸), GST-GLPR (406-419Δ435A⁴³⁸), GST-GLPR (406-435R), y GST-GLPR(406-418R) (200 ng), se incubaron en un tampón que contenía HEPES 20 mM pH 7,4, MgCl₂ 13 mM, CaCl₂ 0,5 mM, fosfatidilserina 50 µg/ml, dioctanoilglicerol 10 µg/ml, PMSF 1 mM, PKC de cerebro de rata 0,045 µg y [³²γP]-ATP (10 µCi/nmol) 10 µM, en un

volumen final de 50 µl durante 20 minutos a 22°C. La reacción de fosforilación se paró por adición de 100 µl de tampón de carga (3,7% SDS, 0,9% sacarosa, 0,012% bromofenol, 2,1% β-mercaptoetanol) y las muestras se calentaron durante 5 minutos a 100°C. Las proteínas fosforiladas fueron analizadas por electroforesis en geles de acrilamida al 9% y posterior autorradiografía.

7.- PALMITOILACIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1

7.1.- Materiales utilizados para el marcaje

El [³H]-palmitico y [³⁵S]- Metionina fueron de Dupont-NEN, Life Science Products, Inc. (Boston, MA, EEUU). La proteína G Sepharosa fue de Amersham. El anticuerpo anti- Flag M2 fue de Sigma.

7.2.- Procedimiento para el ensayo de palmitoilación

Células CHO transfectadas con el tag GLPR-1 y tag GLPR A⁴³⁸, se sembraron en placas de cultivo hasta confluencia en el medio F-12 completo. Tras eliminar este medio se incubaron durante 16 horas a 37°C, con 3 ml del medio de marcaje, que no contiene metionina, con 1% de FBS y 1% de antibióticos y que contenía [³H]-palmitico (200 µCi/ml) o [³⁵S]-metionina (300 µCi/ml) en cada caso. Tras el marcaje, las células se lavaron dos veces con el tampón KRH y se lisaron con tampón de lisis (HEPES 25 mM a pH 7,4, NaCl 0,5 M, EDTA 5mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, desoxicolato 1%, NaF 50 mM, leupeptina 10 µg/ml y PMSF 1mM). Los lisados celulares resultantes se centrifugaron a 20800 g durante 1 hora. El sobrenadante se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con proteína G Sepharosa con el fin de eliminar unión inespecífica a dicha proteína. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 20800 g durante 5 minutos y el sobrenadante se incubó con el anticuerpo previamente unido a la proteína G Sepharosa durante 16 horas a 4°C. Posteriormente los inmunoprecipitados fueron lavados dos veces con el tampón de lisis y una vez con un tampón que contenía HEPES 25 mM, Triton X-100 0,2%, EDTA 1mM, leupeptina 10 µg/ml y PMSF 1mM. Las muestras se resolvieron mediante electroforesis en gel de acrilamida y posterior fluorografía.

RESULTADOS

1.- CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE GLP-1 CONTROL (GLPR-1)

Para los estudios de caracterización del receptor de GLP-1 (GLPR-1), se procedió a transfectar la línea celular CHO con la secuencia del cDNA del receptor introducida en un vector de expresión para células eucariotas, tal como se indicó en el apartado de Materiales y Métodos.

1.1.- Curvas de Asociación de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida a sus receptores en función del tiempo y temperatura

Con el fin de determinar la cinética de unión del ligando GLP-1(7-36)amida a su receptor, las células CHO transfectadas con el receptor de GLP-1 control (GLPR-1) se sembraron en placas de 24 pocillos hasta una densidad de 5×10^4 de células y se realizaron ensayos de asociación de dicho ligando a su receptor a lo largo del tiempo a 4°C y 25°C. La unión total se determinó como la cantidad de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida que permanece unido después de eliminar mediante lavados el péptido libre. La unión específica se obtuvo por la diferencia entre la unión total y el [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida que permanece unido en presencia de un exceso de ligando no marcado, (unión inespecífica). Como se puede observar en la figura 13 la unión específica fue dependiente del tiempo y de la temperatura de forma que a 25°C la capacidad de asociación del ligando a su receptor aumentó de manera dependiente del tiempo de incubación hasta estabilizarse a partir de los 90 minutos. En cambio, la curva de asociación obtenida para el receptor control a 4°C fue también dependiente del tiempo, pero no se alcanzó la estabilización en los 120 minutos estudiados.

Debido a que a 25°C puede producirse la endocitosis del receptor, determinamos la afinidad del ligando-receptor y el número de receptores expresados en la superficie celular realizando los experimentos a 4°C durante 16 horas.

Estos experimentos se llevaron a cabo con diferentes clones que expresaban diferente número de receptores, obteniéndose resultados similares.

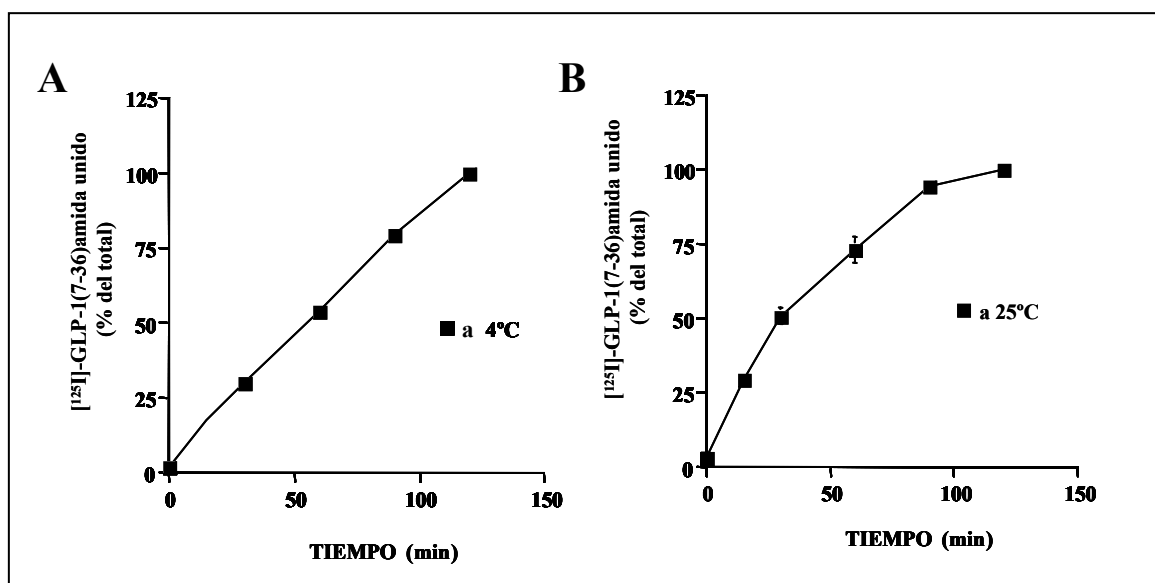


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre la asociación de $[^{125}\text{I}]\text{-GLP-1(7-36)amida}$ en células CHO transfectadas con el receptor de GLP-1. Los valores de asociación se expresan como el porcentaje unido respecto de la cantidad total de $[^{125}\text{I}]\text{-GLP-1(7-36)amida}$ unido. En el panel A se muestra la asociación a 4°C mientras que en el panel B se representa la curva de asociación a 25°C. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos.

1.2.- Interacciones ligando-receptor

1.2.1.- Curvas de desplazamiento de $[^{125}\text{I}]\text{-GLP-1(7-36)amida}$ a su receptor e identificación de los complejos ligando-receptor

Para estudiar la afinidad del ligando GLP-1(7-36)amida por su receptor así como el número de receptores, las células que expresan el receptor de GLP-1 se incubaron durante 16 horas a 4°C con 0,1 nM de $[^{125}\text{I}]\text{-GLP-1(7-36)amida}$, y con concentraciones crecientes (entre 0,04 nM y 500 nM) del péptido GLP-1(7-36)amida, sin marcar radiactivamente, determinándose la unión específica para cada una de las concentraciones. Los complejos ligando-receptor, fueron identificados mediante autorradiografía de los geles de poliacrilamida tras su electroforesis en condiciones reductoras. La unión covalente entre el ligando marcado y el receptor se realizó utilizando el reactivo DSS, como se describió en Materiales y Métodos.

Los datos obtenidos de estos ensayos se representan en la figura 14. En el panel A se muestra un autorradiograma representativo, en el que se destacan las bandas

correspondientes a los complejos ligando-receptor, con una masa molecular de 68 kDa. Se muestra la correlación entre la unión específica de [125 I]-GLP-1(7-36)amida y la cantidad de complejo ligando-receptor detectado mediante autorradiografía. Como se puede observar a partir de concentraciones de 1 nM de GLP-1(7-36)amida, la intensidad de la banda va desapareciendo hasta ser inapreciable a dosis de 200 nM de GLP-1(7-36)amida.

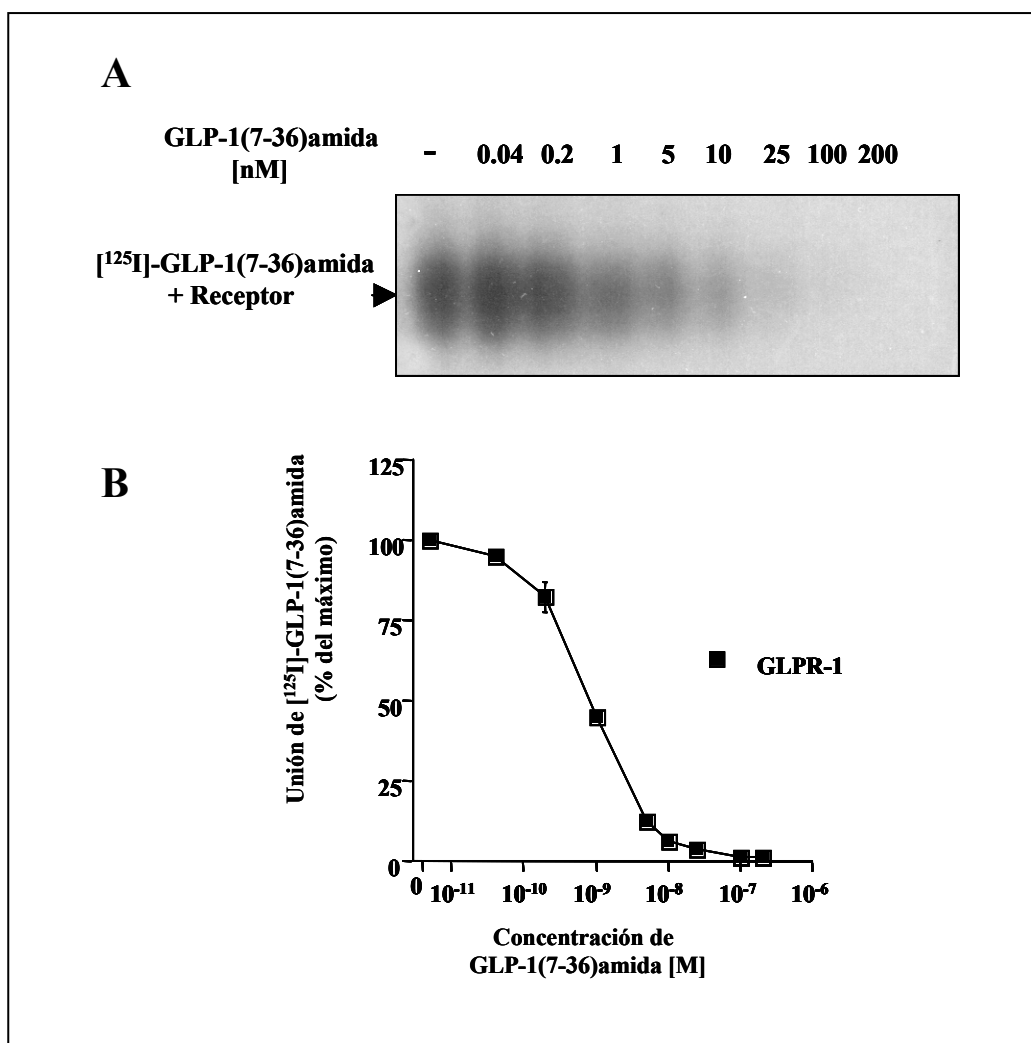


Figura 14.- Curva de desplazamiento de [125 I]-GLP-1(7-36)amida unido a su receptor y autorradiograma de los complejos ligando-receptor de los ensayos de desplazamiento. En el panel A se representa un autorradiograma de los complejos ligando-receptor después de la unión covalente y posterior electroforesis. En el panel B se muestra el porcentaje de [125 I]-GLP-1(7-36)amida que permanece unido en función del aumento de la concentración de GLP-1(7-36)amida no radiactivo. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos.

En el panel B de la figura 14, se expresa el porcentaje de [125 I]-GLP-1(7-36)amida unido específicamente frente a la concentración de ligando total. Los datos revelan que la

unión del ligando radiactivo a su receptor se desplazó al aumentar la concentración de ligando no marcado, siendo el desplazamiento completo a una concentración de 10^{-7} M de GLP-1(7-36)amida.

Los datos de desplazamiento se analizaron mediante análisis de Scatchard con el programa Ligand y se representan en la figura 15. La curva indica que la transfección de las células CHO con el cDNA del receptor de GLP-1 generó receptores con una constante de disociación (Kd) y una capacidad de unión máxima (Bmax) de 1,6 nM y 67,8 fmol unidos/ 5×10^4 células respectivamente.

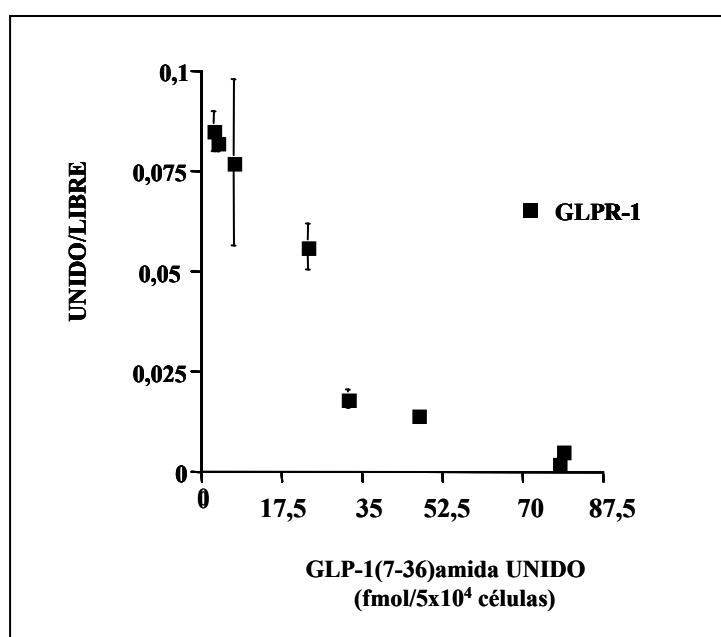


Figura 15.- Análisis de Scatchard de la unión de $[^{125}\text{I}]$ -GLP-1(7-36)amida a las células transfectadas con los receptores de GLP-1. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos.

1.3.- Análisis de la transducción de señales generadas desde el receptor de GLP-1

Como ya se ha citado, el receptor de GLP-1 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y se caracteriza por transmitir su efecto al interior celular a través del sistema de la adenilato ciclasa, siendo el AMPc su principal segundo mensajero. Además existen trabajos recientes (Montrose-Rafizadeh y cols., 1999) donde se demuestra que este tipo de receptores son capaces de activar también la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

1.3.1.- Estudio de la activación del sistema de la adenilato ciclasa. Medida de la producción de AMPc

Con objeto de estudiar la capacidad del GLP-1(7-36)amida para estimular la vía de la adenilato ciclasa mediante GLPR-1, las células CHO transfectadas con el receptor de GLP-1, se sembraron en placas de 6 pocillos hasta su confluencia y posteriormente se realizaron dos tipos de ensayos. En primer lugar fueron estimuladas durante 15 minutos con concentraciones crecientes del ligando comprendidas entre 0,1 nM y 1 μ M. El segundo ensayo fue realizado con el fin de evaluar la desensibilización de los receptores. Para ello se realizó una estimulación previa de dichas células con una concentración fija de ligando y se analizó el efecto de la estimulación durante 15 minutos con concentraciones crecientes del ligando, siempre en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa, la isobutilmetilxantina (IBMX).

En la figura 16, se puede observar la producción de AMPc en dichas células frente las diferentes concentraciones de ligando utilizadas, observándose que la producción máxima se alcanzó a la dosis de 10 nM de GLP-1(7-36)amida, a partir de la cual se produjo una saturación o estabilización de la señal. El tratamiento previo con 10 nM de GLP-1(7-36)amida, produjo una disminución de un 20% de la producción de AMPc, es decir, que se observó una desensibilización del receptor o una menor capacidad de respuesta tras la exposición al agonista. Este fenómeno se ha descrito por muchos autores como desensibilización homóloga.

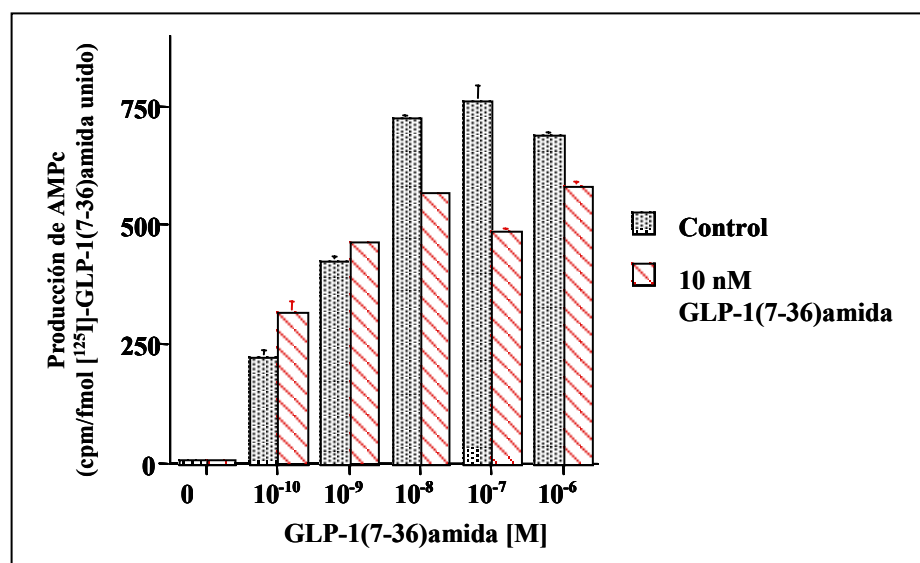


Figura 16. Activación de la cascada de la adenilato ciclasa tras la estimulación con GLP-1(7-36)amida. La gráfica representa la producción de AMPc en función de la concentración del péptido medida como cpm de [³H]-AMPc producidas por fmol de GLP-1(7-36)amida unido (▨) así como tras la estimulación previa con una concentración de 10 nM de GLP-1(7-36)amida (▨). Los resultados son las medias ± SEM de al menos 3 experimentos.

1.3.2.- Efecto de la estimulación con el agonista sobre la activación de la vía de las MAPKs

Algunos receptores acoplados a proteínas G son capaces de promover la fosforilación de miembros de la cascada de las MAP quinasas. Para estudiar si el receptor de GLP-1 tiene algún efecto en la señalización a través de la vía de las MAP quinasas, se analizaron los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/ERK2. Estas proteínas de 44 y 42 kDa respectivamente pertenecen a la familia de las MAP quinasas y son activadas mediante la fosforilación por quinasas que intervienen en esta cascada de señalización.

Las células CHO transfectadas con el receptor se trataron con 10 nM de GLP-1(7-36)amida a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos). Posteriormente las proteínas ERK1/ERK2 fosforiladas fueron identificadas mediante "Western blot".

Según puede apreciarse en la figura 17 el tratamiento con GLP-1(7-36)amida 10 nM produce un aumento de la fosforilación de dichas quinasas ERK1/ERK2 dependiendo

del tiempo de estimulación, siendo máxima a los 5 minutos y produciéndose una disminución progresiva del efecto hasta ser casi inapreciable a partir de los 15 minutos.

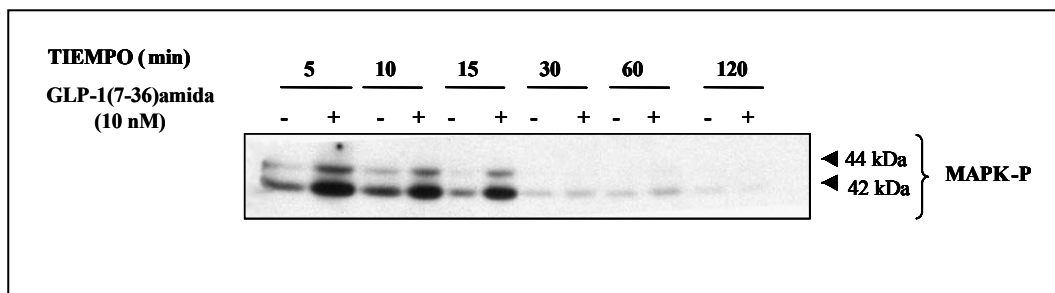


Figura 17.- Identificación mediante "Western blot" de las formas fosforiladas de las proteínas ERK1/ERK2 tras la estimulación con GLP-1(7-36)amida, en función del tiempo. Autorradiograma representativo de los niveles de fosforilación de las proteínas quinasas ERK1/ERK2 en función del tiempo de estimulación con GLP-1(7-36)amida.

1.4.- Cinética de endocitosis y redistribución del receptor de GLP-1

1.4.1.- Endocitosis del receptor de GLP-1

Uno de los fenómenos esenciales para la regulación de procesos de transducción de señales es la capacidad de internación del receptor. La constante aparente de primer orden de endocitosis para la internación de GLP-1(7-36)amida fue determinada mediante el método de IN/SUR (Wiley y Cunningham, 1982). Esta constante define la probabilidad de que un receptor de membrana unido a su ligando sea internado en un minuto a 37°C. Dicha constante, que es independiente de la afinidad del receptor por el ligando, se calcula a partir de la representación de la relación entre el ligando internado y el ligando unido a la superficie celular (denominada IN/SUP en nuestras gráficas) en función del tiempo. Para utilizar este método debe existir un periodo de latencia entre la internación y el reciclaje del receptor, así como un mantenimiento relativamente constante del ligando unido a la superficie celular a lo largo del tiempo. El tratamiento de las células con tampón ácido a pH 3 durante tres minutos, nos sirvió para disociar el ligando unido a la superficie celular (Haigler y cols., 1980; Lamb y cols., 1983), pudiéndose así determinar el [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida que se encuentra en el interior celular. De este modo la radiactividad unida a la superficie celular se estimó mediante la diferencia entre la radiactividad total e intracelular.

Experimentos controles demostraron que el procedimiento del lavado ácido causó la disociación del 85-95% del [125 I]-GLP-1(7-36)amida unido específicamente a los receptores que se encuentran en la superficie celular.

Como se puede observar en el panel A de la figura 18, la unión en la superficie celular permaneció constante a lo largo del tiempo, a la vez que se observa un aumento dependiente del tiempo de la radiactividad total y de la radiactividad medida en el interior celular.

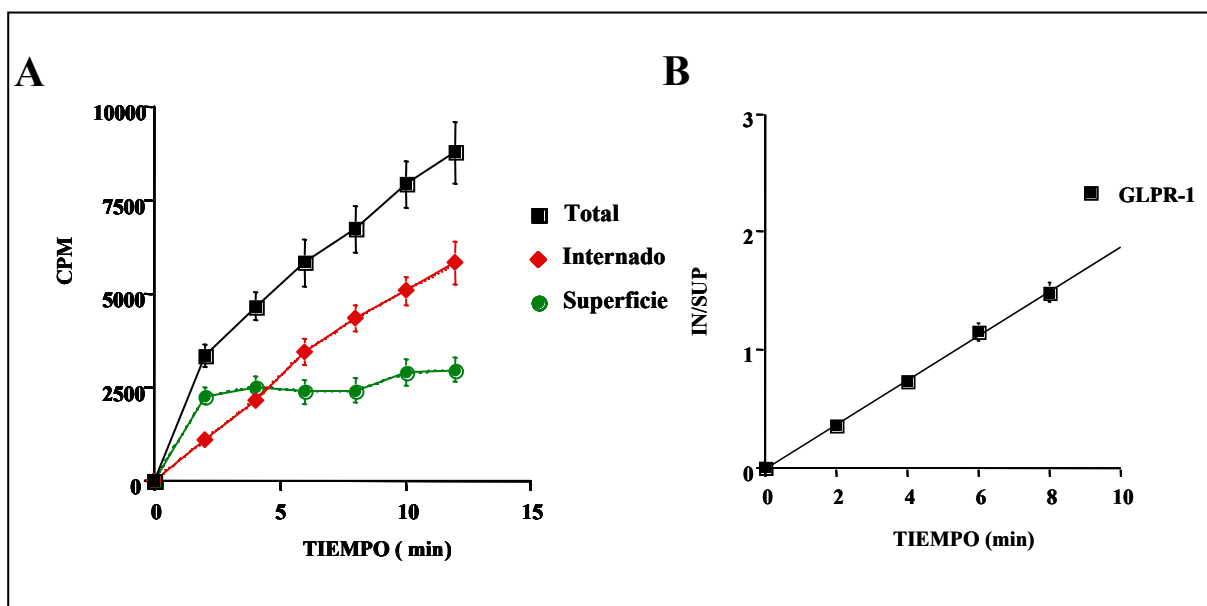


Figura 18.- Ensayos de endocitosis del receptor de GLP-1. En el panel A se representa la unión total de [125 I]-GLP-1(7-36)amida(■), la unión en la superficie(●) o en el interior celular(◆) en función del tiempo. En el gráfico del panel B se representa el cociente entre el [125 I]-GLP-1(7-36)amida y el unido en la membrana celular entre 2 y 8 minutos a 37°C. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 8 experimentos.

Por otro lado, a partir de la gráfica IN/SUP de la figura 18 panel B, se determinó la tasa de endocitosis para el receptor de GLP-1. En nuestros resultados la constante de primer orden fue calculada entre 2 y 8 minutos, siendo de $0,196 \pm 0,0157$ ($n = 8$).

1.4.2.- Ensayos de redistribución

Con el fin de examinar el efecto que la preexposición al agonista producía sobre el número de receptores en la superficie celular, las células CHO transfectadas con el receptor de GLP-1, fueron preincubadas con 10 nM de GLP-1(7-36)amida a 37°C durante diferentes tiempos. Esto dio lugar a una disminución en el número de receptores en la superficie celular de manera progresiva y dependiente del tiempo, durante los primeros 15 minutos de incubación. En la figura 19 se observa como para el receptor de GLP-1 control, esta disminución fue de un 60% a los 15 minutos de su exposición al agonista. El reciclamiento de los receptores permite que el número de receptores en la superficie celular sea estable a tiempos más largos.

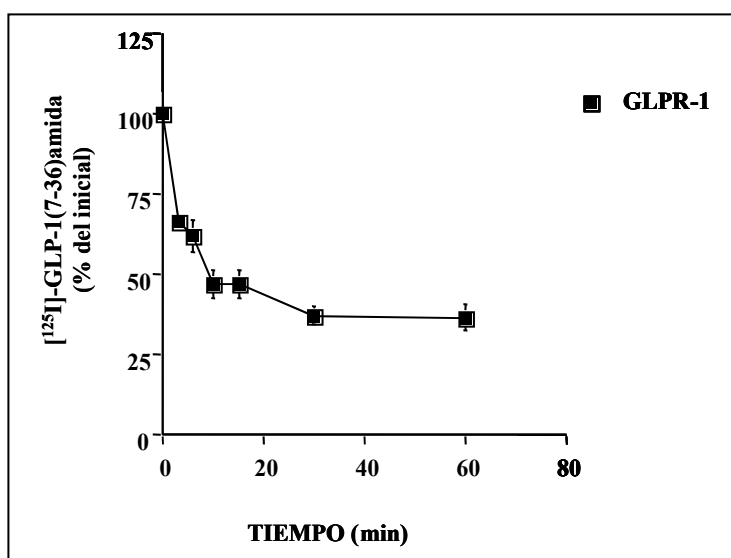


Figura. 19.- Redistribución de los receptores de GLP-1 en presencia del ligando. La gráfica representa el porcentaje de unión de ligando marcado a receptores en la superficie celular respecto a la unión inicial tras la preexposición al agonista. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 6 experimentos.

2.- CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE GLP-1 CON DELECCIONES EN SU EXTREMO CARBOXILO TERMINAL, ASI COMO MUTACIONES PUNTUALES EN LOS AMINOÁCIDOS 408-410

Uno de los estudios realizados, ha sido la investigación sobre el papel del extremo carboxilo terminal del receptor en el proceso de endocitosis y en la capacidad de señalización inducida desde dicho receptor. Para ello hicimos una serie de deleciones en el extremo C-terminal del receptor, obteniéndose los receptores denominados GLPR 418R, que contiene un dominio C-terminal intracelular de 12 aminoácidos y GLPR 435R, de 29 aminoácidos en su extremo carboxilo terminal (Figura 20).

También estudiamos el efecto de las sustituciones de los aminoácidos 408, 409 y 410 próximos a la séptima región de transmembrana del receptor, glutamato, valina y glutamina (EVQ) por alaninas (AAA), obteniéndose el receptor modificado llamado GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰. Este último se consiguió mediante técnicas de mutagénesis con PCR como ya se describió en el apartado de Materiales y Métodos.

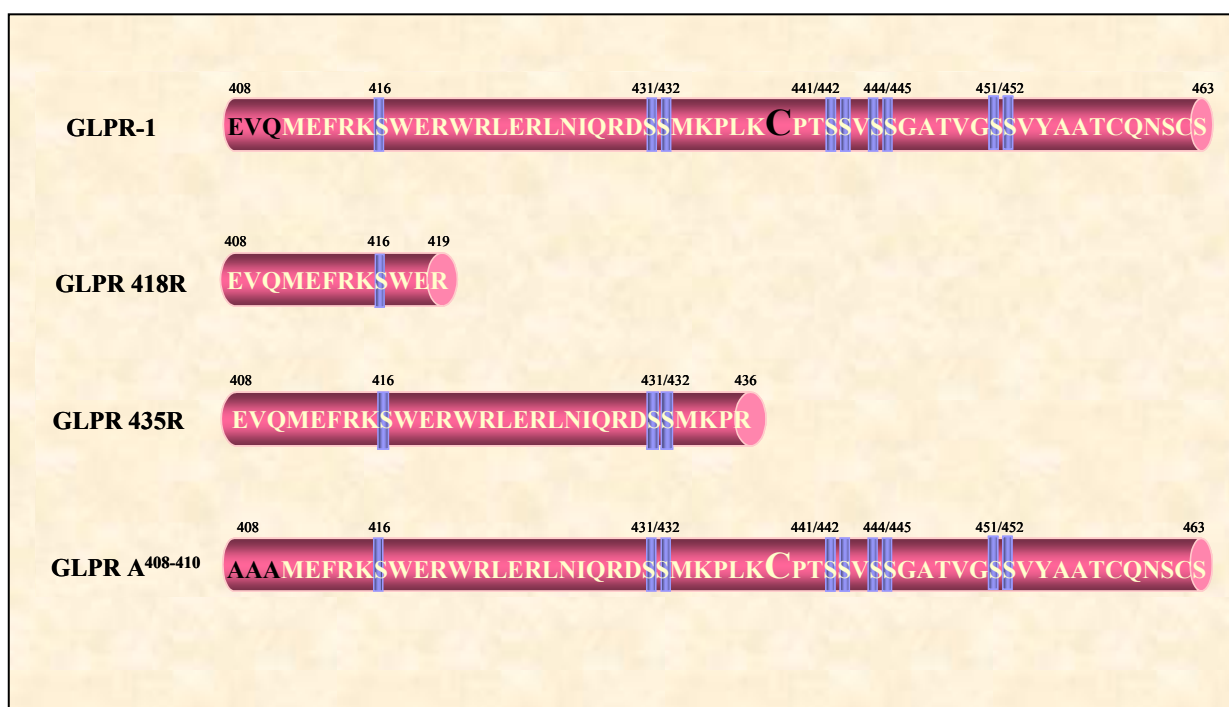


Figura 20.- Esquema del extremo carboxi-terminal del receptor de GLP-1 control y de los receptores obtenidos tras los procesos de mutagénesis. Las barras verticales representan la localización de las diferentes serinas encontradas en dicha secuencia.

2.1.- Efecto de las mutaciones en la interacción ligando-receptor

2.1.1.- Ensayos de desplazamiento de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida

Las células CHO transfectadas con cada uno de estos receptores fueron incubadas en presencia de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida y se estudió la capacidad de unión específica, así como el desplazamiento por concentraciones crecientes de ligando sin marcar.

Como se puede observar para los receptores GLPR 418R y GLPR 435R representados en la figura 21, las curvas de desplazamiento fueron similares al GLPR-1 control. Las células CHO que se transfectaron con el receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ expresaron muy bajo número de receptores por lo que no fue posible realizar estos ensayos de desplazamiento.

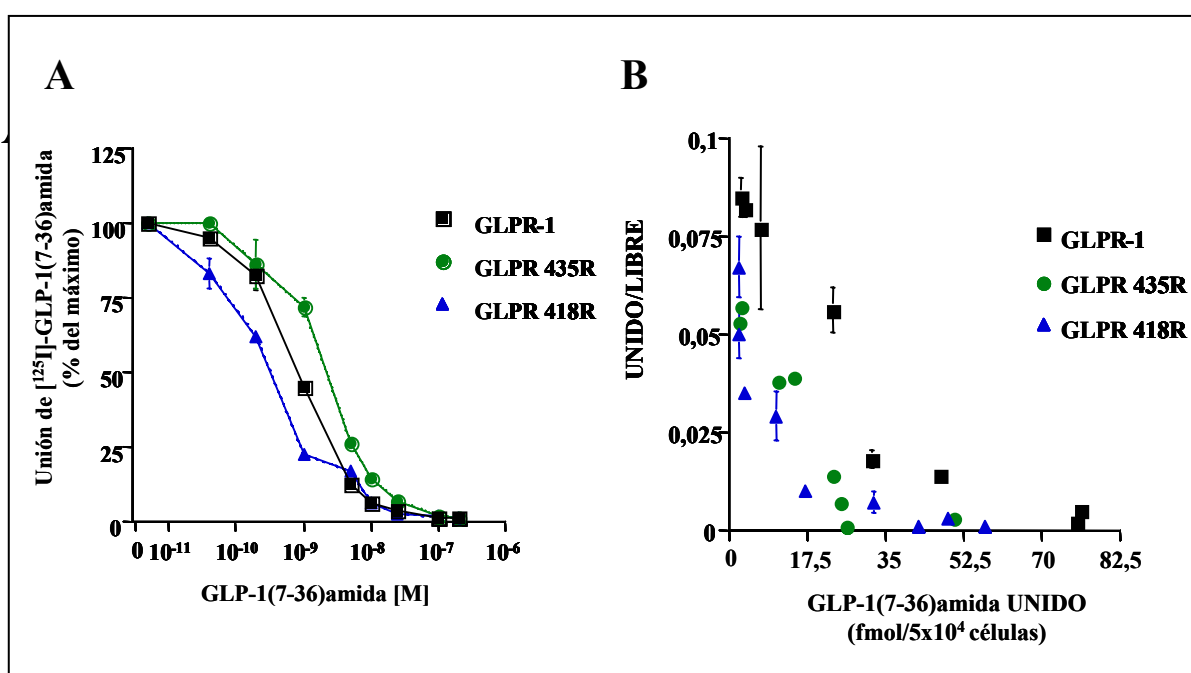


Figura 21. - Curvas de desplazamiento de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido a células CHO que expresan los receptores GLPR-1, GLPR 435R y GLPR 418R. En la gráfica A se representa el porcentaje de ligando marcado que permanece unido a los receptores a diferentes concentraciones de GLP-1. En el panel B, se han representado los análisis de Scatchard obtenidos de los datos del panel A. Los resultados son las medias ± SEM de al menos 3 experimentos.

El análisis de Scatchard de los datos de desplazamiento realizados para estos dos tipos de receptores indicó que, según se observa en el panel B de la figura 21, las células transfectadas con los receptores GLPR 435R y GLPR 418R tienen una afinidad similar por el ligando (no existen diferencias significativas con la del receptor control) pero un menor número de receptores que las células transfectadas con el receptor control (Tabla 1).

Tabla 1.- Datos resultantes de los análisis de Scatchard, realizados mediante el programa Ligand. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos.

	K_d [nM]	Bmax (fmol/5x10⁴ células)
GLPR-1	1,6 \pm 0,611	67,8 \pm 6
GLPR 435R	1,5 \pm 0,3	35,6 \pm 4,6
GLPR 418R	2,25 \pm 0,48	46,4 \pm 2,8

2.1.2.- Identificación de los complejos ligando-receptor

Los experimentos de “cross-linking” sirvieron para identificar en cada caso los complejos ligando-receptor en las células transfectadas con cada uno de los tipos de receptores. En la figura 22, podemos observar dichos complejos para cada uno de los receptores analizados. Así podemos apreciar pequeñas diferencias en las masas moleculares de estos complejos, oscilando entre 66 y 72 kDa, siendo de 68 kDa para el receptor control y de 69, 66 y 72 kDa para los complejos ligando-receptor GLPR 418R, GLPR 435R y GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰, respectivamente.

En la parte derecha de la figura 22 se observa la desaparición completa de dichos complejos ligando radiactivo receptor en presencia de un exceso de ligando no marcado, lo que indica la especificidad de esta interacción.

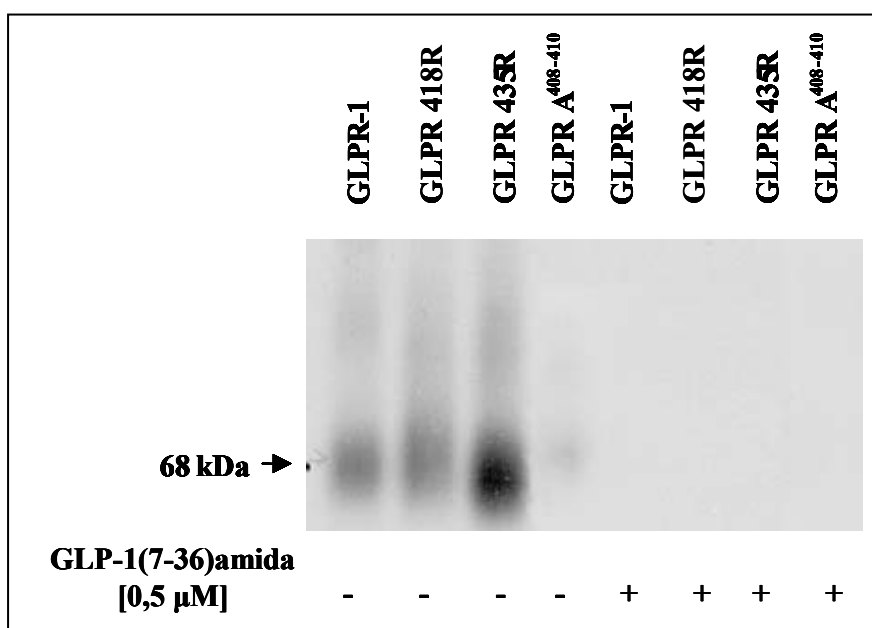


Figura 22.- Autorradiograma representativo de los experimentos de "cross-linking". Las diferentes bandas representan el complejo ligando marcado-receptor, para los receptores GLPR-1, GLPR 418R, GLPR 435R y GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰, en ausencia (-) o en presencia (+) de 0,5 μM GLP-1(7-36)amida.

2.2.- Comparación de los mecanismos de transducción de señales en los receptores mutados y el control

La producción de segundos mensajeros es uno de los procesos determinantes para el estudio de la transducción de señales que ocurre tras la unión de un determinado ligando a su receptor. En nuestro caso al ser receptores acoplados a proteínas G y al sistema de la adenilato ciclasa, hemos cuantificado la producción de AMPc y la activación de la vía de las MAP quinasas.

2.2.1.- Producción de AMPc

Las células CHO transfectadas con cada uno de estos receptores fueron estimuladas con concentraciones crecientes de GLP-1(7-36)amida. La producción de AMPc para cada una de ellas se midió según se ha indicado en Materiales y Métodos.

Las deleciones del extremo carboxilo terminal, presentes en los receptores GLPR 418R y GLPR 435R, indujeron un aumento de la producción de AMPc a bajas

concentraciones del agonista, mientras que la formación de AMPc no varió con respecto al control a concentraciones mayores de 10 nM (Figura 23). En las células que expresaban el receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰, apenas se detectó producción de AMPc a cualquiera de las concentraciones de GLP-1(7-36)amida utilizadas, pero se observó también una producción de AMPc basal mas alta que en el resto de las líneas celulares.

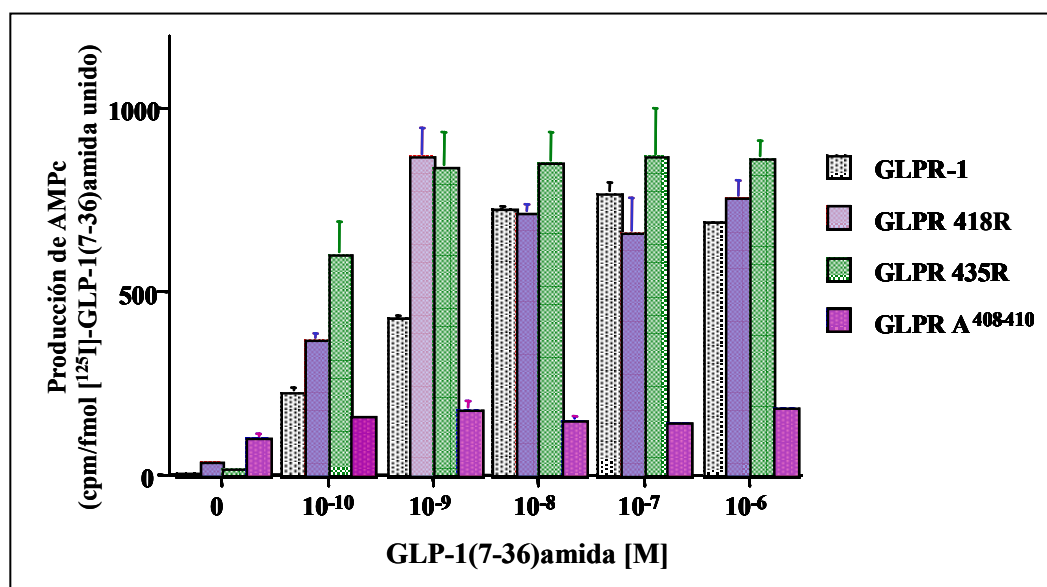


Figura 32.- Comparación de la actividad de la adenilato ciclasa en células que expresan receptores de GLP-1(7-36)amida control y mutados. Concentración intracelular de AMPc por fmol de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido tras la estimulación con diferentes concentraciones de agonista. CHO GLPR-1 (▨), CHO GLPR 418R (■), CHO GLPR 435R (■) y CHO GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ (■). Los resultados representan la media ± SEM, n=3-5.

El estudio de la desensibilización homóloga, es decir, el efecto que la estimulación previa de las células con una concentración 10 nM de GLP-1(7-36)amida durante 15 minutos, provocó en las concentraciones intracelulares de AMPc se representa en la figura 24. En los paneles A y B se refleja el efecto de dicha preestimulación en las células que expresan los receptores GLPR 435R y GLPR 418R respectivamente y, en ningún caso se produjo una disminución de la producción de AMPc a las dosis de GLP-1(7-36)amida estudiadas. Estos receptores no se desensibilizaron en respuesta a la estimulación previa con el agonista y la concentración de AMPc fue, en todos los puntos estudiados, igual o superior a la basal.

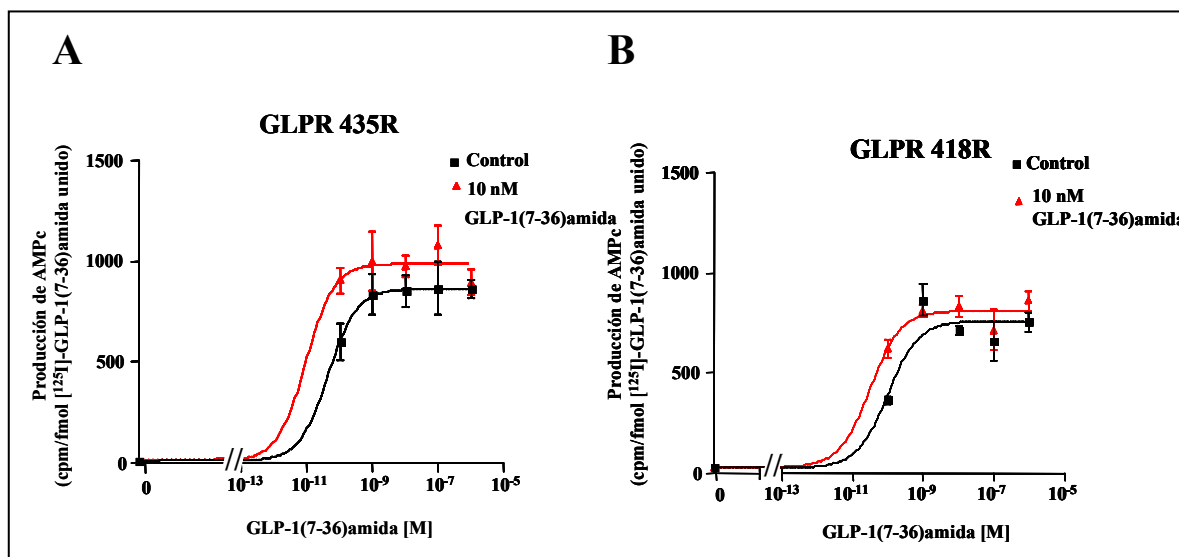


Figura 24.- Actividad de la adenilato ciclasa en células que expresan receptores GLPR 435R y GLPR 418R. En las gráficas se representa la producción de AMPc medida como cpm de [³H]-AMPc producidos por fmol de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido tras la estimulación con diferentes concentraciones del agonista (■ Control). Respuesta tras la estimulación previa con 10 nM de GLP-1(7-36)amida durante 15 minutos (▲) Panel A, CHO GLPR 435R. Panel B, CHO GLPR 418R.

2.2.2.- Estimulación de la vía de señalización de las MAP quinasas

Las células CHO que expresan el receptor GLPR-1 control son capaces de incrementar la concentración de las formas fosforiladas de las proteínas ERK1/ERK2 tras su estimulación con 10 nM de GLP-1(7-36)amida.

El efecto del GLP-1(7-36)amida sobre la actividad MAP quinasa en células que expresan receptores GLPR 418R, GLPR 435R y GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ fue también estudiada. La estimulación fue dependiente del tiempo como se indica en la figura 25 (paneles A y B) siendo máxima a los 15 minutos en los dos casos y desapareciendo a tiempos mas largos.

En el panel C, se observa la estimulación de las formas fosforiladas ERK1/ERK2, para las células que expresan el receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰. En estas células la concentración basal de las formas fosforiladas de estas proteínas fue alta mientras que la estimulación de la fosforilación fue baja y solo se observó a tiempos cortos.

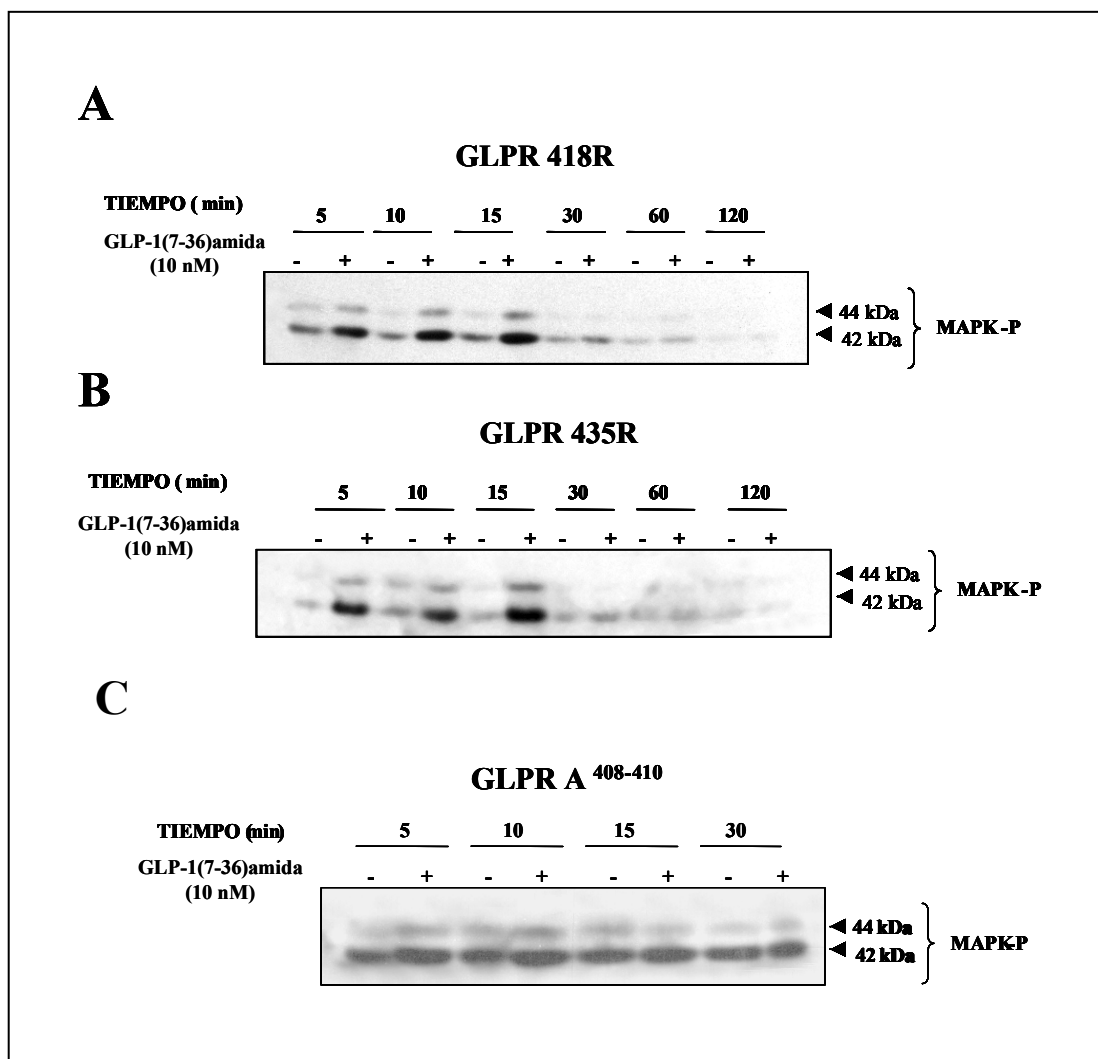


Figura 25.- Efecto del GLP-1(7-36)amida sobre la actividad MAP quinasa en células que expresan los receptores GLPR 418R, GLPR 435R y GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰. En los paneles A, B y C se muestran los autorradiogramas representativos de la fosforilación de ERK1/ERK2 obtenida tras la estimulación con el agonista de los receptores GLPR 418R, GLPR 435R y GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ en función del tiempo.

2.3.- Cinética de endocitosis y redistribución

2.3.1.- Experimentos de internación

El extremo carboxilo del receptor de GLP-1(7-36)amida parece ser fundamental en los procesos de internación del receptor. Por ello, estas deleciones en dicho extremo intracelular podrían ser de gran utilidad para delimitar los residuos implicados en el proceso de internación del receptor de GLP-1.

El número de receptores en la superficie celular se mantuvo prácticamente sin variaciones entre 4 y 12 minutos, y la tasa de endocitosis siguió una progresión lineal hasta los 8 minutos.

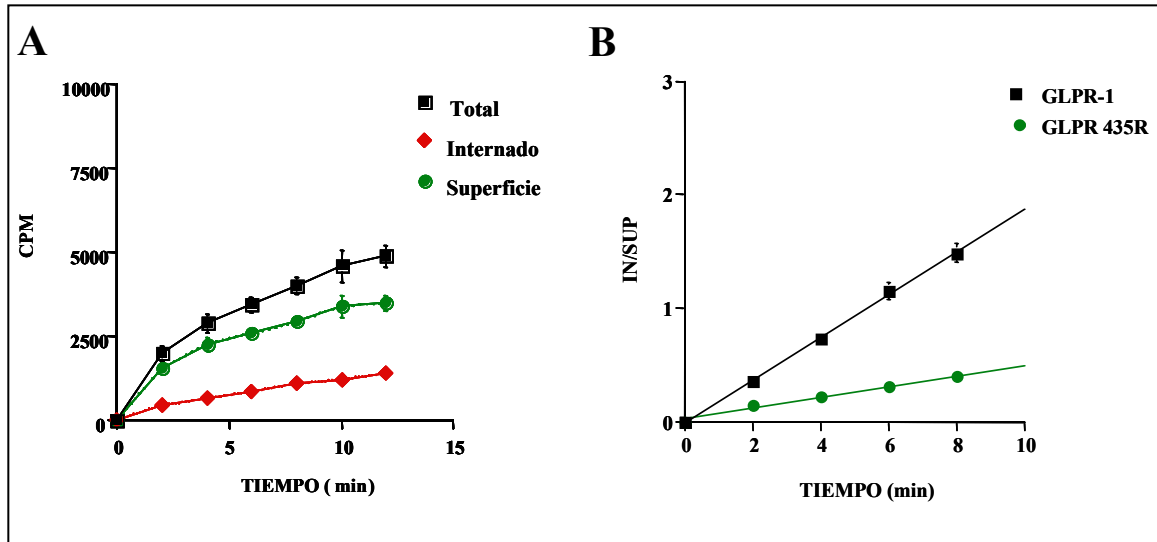


Figura 26.- Ensayos de endocitosis en las células CHO que expresan receptores GLPR 435R. Las gráficas del panel A muestran la cantidad de $[^{125}\text{I}]$ -GLP-1(7-36)amida total (■), en la superficie (●) o en el interior celular (◆), en función del tiempo. En el panel B se representa el cociente IN/SUP obtenido, en función del tiempo de incubación a 37°C.

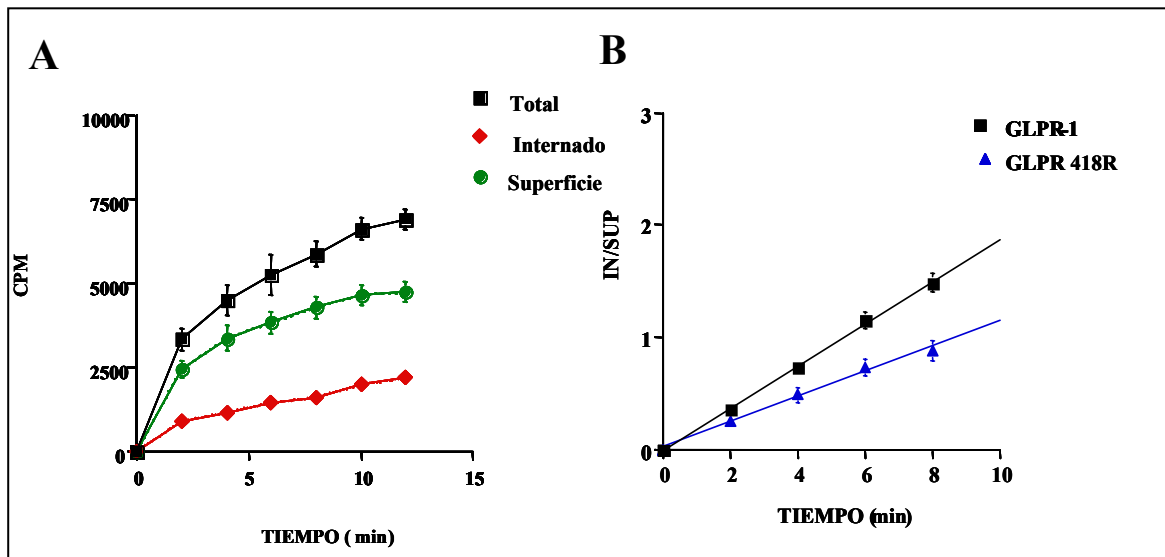


Figura 27- Ensayos de endocitosis en las células CHO que expresan receptores GLPR 418R. En el panel A se muestra en función del tiempo la unión de $[^{125}\text{I}]$ -GLP-1(7-36)amida total (■), a la superficie (●) o en el interior celular (◆). En el panel B se representa el cociente IN/SUP obtenido en función del tiempo de incubación a 37°C.

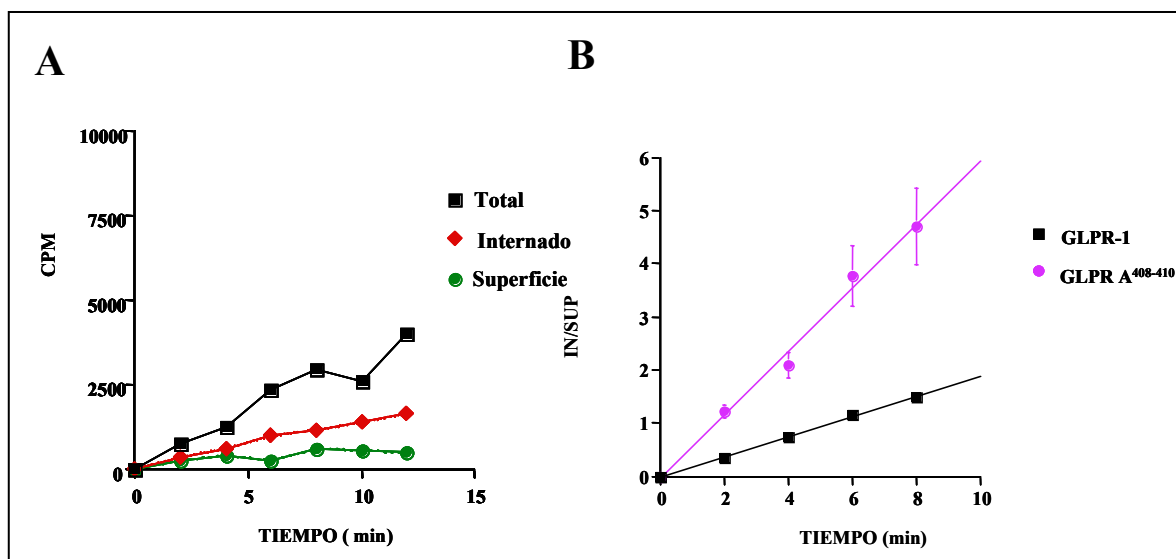


Figura 28- Ensayos de endocitosis en las células CHO que expresan receptores GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰. En el panel A se muestra en función del tiempo la unión de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida total (■), a la superficie (●) o en el interior celular (◆). En el panel B se representa el cociente IN/SUP obtenido en función del tiempo de incubación a 37°C.

Como se puede observar en los paneles A y B de la figura 26, la delección de 27 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (GLPR 435R) disminuyó en un 78% la tasa de endocitosis, mientras que la delección de 44 aminoácidos (GLPR 418R, figura 27), produjo una inhibición del 47%, existiendo diferencias significativas respecto del control a partir de los 2 minutos del estudio. En cambio en la figura 28, se observa como para el receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ la internación fue muy rápida, siendo un 196 % mas que en el caso del receptor control. Todos estos resultados se han expresado en la tabla 2.

Tabla 2.- Tasa de endocitosis, entre 2 y 8 minutos para cada tipo de receptor estudiado. Las tasas de endocitosis (constante aparente de primer orden) fueron calculadas a partir de los datos de internación de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida. Los resultados representan la media \pm SEM de al menos 8 experimentos.

	Tasa de Endocitosis (min⁻¹)	% /control
GLPR -1	0,196 \pm 0,0157	100
GLPR 418R	0,104 \pm 0,011	53,06
GLPR 435R	0,0426 \pm 0,0025	21,73
GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰	0,58 \pm 0,079	296
GLPR A^{431/432}	0,178 \pm 0,014	90,8

Las diferencias en la tasa de endocitosis entre los receptores GLPR 418R y GLPR 435R podría indicar que en el segmento comprendido entre los aminoácidos 419 y 435 existe alguna señal que regularía negativamente la endocitosis. Debido a que los procesos de fosforilación suelen estar implicados en los mecanismos de endocitosis, y que las serinas suelen ser dianas de fosforilación para muchas quinasas intracelulares obtuvimos un nuevo mutante, sustituyendo de manera puntual las serinas situadas en posición 431/432, por alaninas. La tasa de endocitosis encontrada para el receptor GLPR A^{431/432} fue de 0,178 \pm 0,014, ligeramente menor pero sin diferencias significativas respecto del receptor control (tabla 2 y figura 29). Esto indicaría que las serinas 431/432 no estarían implicadas de manera directa en el proceso de endocitosis.

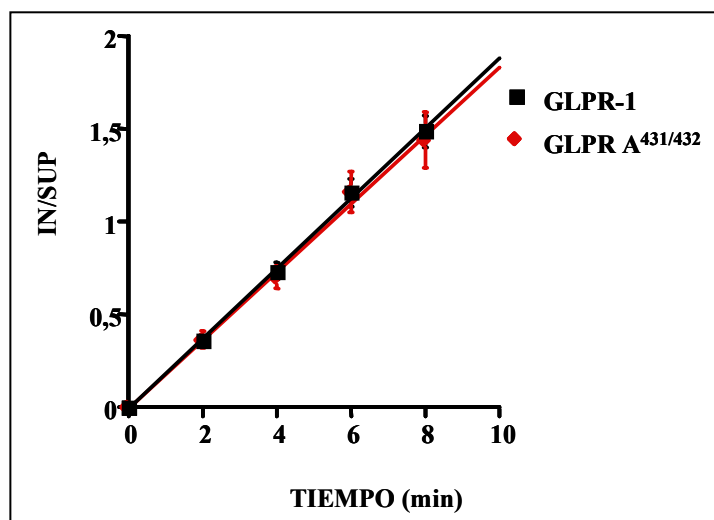


Figura 29.- Ensayos de endocitosis en las células CHO que expresan receptores GLPR A^{431/432}. Cociente IN/SUP obtenido en función del tiempo de incubación. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 8 experimentos.

2.3.2.- Estudio del mecanismo de endocitosis del receptor de GLP-1

Para estudiar si los receptores de GLP-1 control y mutantes son internados utilizando vesículas recubiertas de clatrina u otras vías, se realizaron los ensayos de endocitosis en presencia de inhibidores metabólicos para analizar si el proceso es dependiente de energía, estudiándose además el efecto del tratamiento con un medio hipertónico que induce una polimerización anormal de la clatrina (Heuser y Anderson, 1989). Según se observa en la figura 30, el tratamiento con inhibidores metabólicos y medio hipertónico produjeron una disminución de la tasa de la endocitosis similares en el receptor de GLP-1 control y en los mutantes GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ y GLPR A^{431/432}. En el caso del receptor GLPR 435R, tanto el tratamiento hipertónico como con inhibidores metabólicos produjo una disminución de aproximadamente el 55% de la tasa de endocitosis. En el caso del GLPR 418R la presencia de inhibidores metabólicos provocó una inhibición del 55% y el tratamiento hipertónico produjo una disminución del 30%. La endocitosis del 25-30% de estos receptores puede ser mediada a través de vesículas no recubiertas de clatrina.

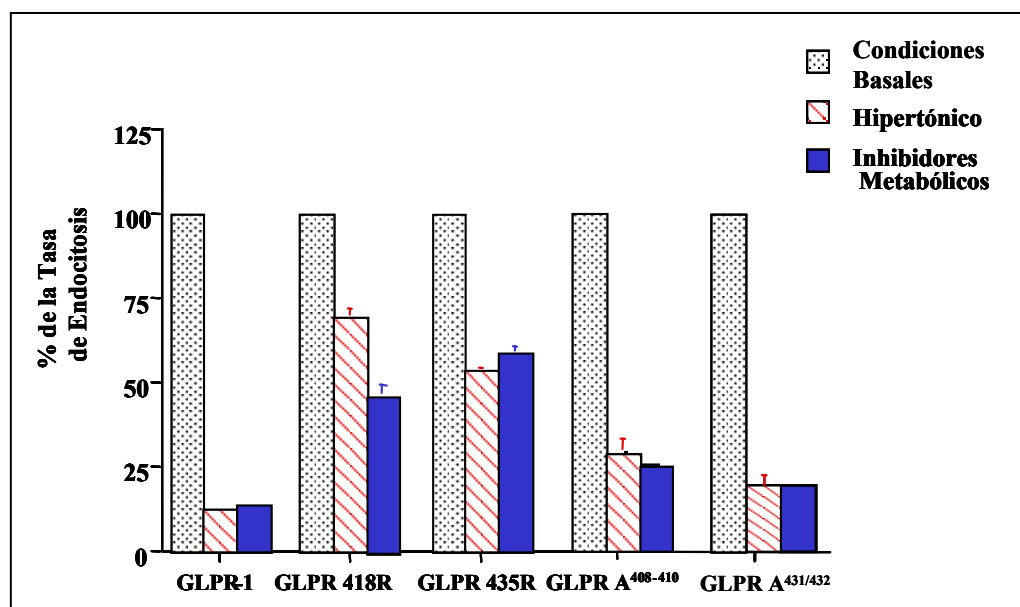


Figura 30.- Efecto del tratamiento con inhibidores metabólicos y medio hipertónico sobre la tasa de endocitosis en las células que expresan los receptores GLPR-1, GLPR 418R, GLPR 435R, GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ y GLPR A^{431/432}. Las tasas de endocitosis fueron calculadas como el porcentaje respecto a la tasa de endocitosis en condiciones basales (▨), tras el tratamiento con inhibidores metabólicos (■) o medio hipertónico (▩). Los resultados son la media ± SEM de al menos 3 experimentos.

2.3.3.- Ensayos de redistribución

En las células transfectadas con receptor de GLP-1 control, la cantidad de receptores que permanecen en la superficie celular a lo largo del tiempo tras una estimulación previa con 10 nM de GLP-1(7-36)amida, fue disminuyendo de manera tiempo dependiente hasta un 60% a los 15 minutos de exposición y se mantuvo hasta tiempos más largos por efecto del reciclamiento. En cambio, para las células transfectadas con los receptores GLPR 435R y GLPR 418R, el número de receptores en la superficie celular disminuyó solo un 15% en los primeros 15 minutos manteniéndose constante a lo largo del tiempo, según se puede observar en la figura 31 paneles A y B.

En el caso del receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰, se produjo una disminución de manera muy rápida del número de receptores en la superficie celular, incluso al tiempo mas corto del ensayo, manteniendo en superficie solo un 13% de los receptores iniciales a los 15 minutos de incubación (figura 31 panel C).

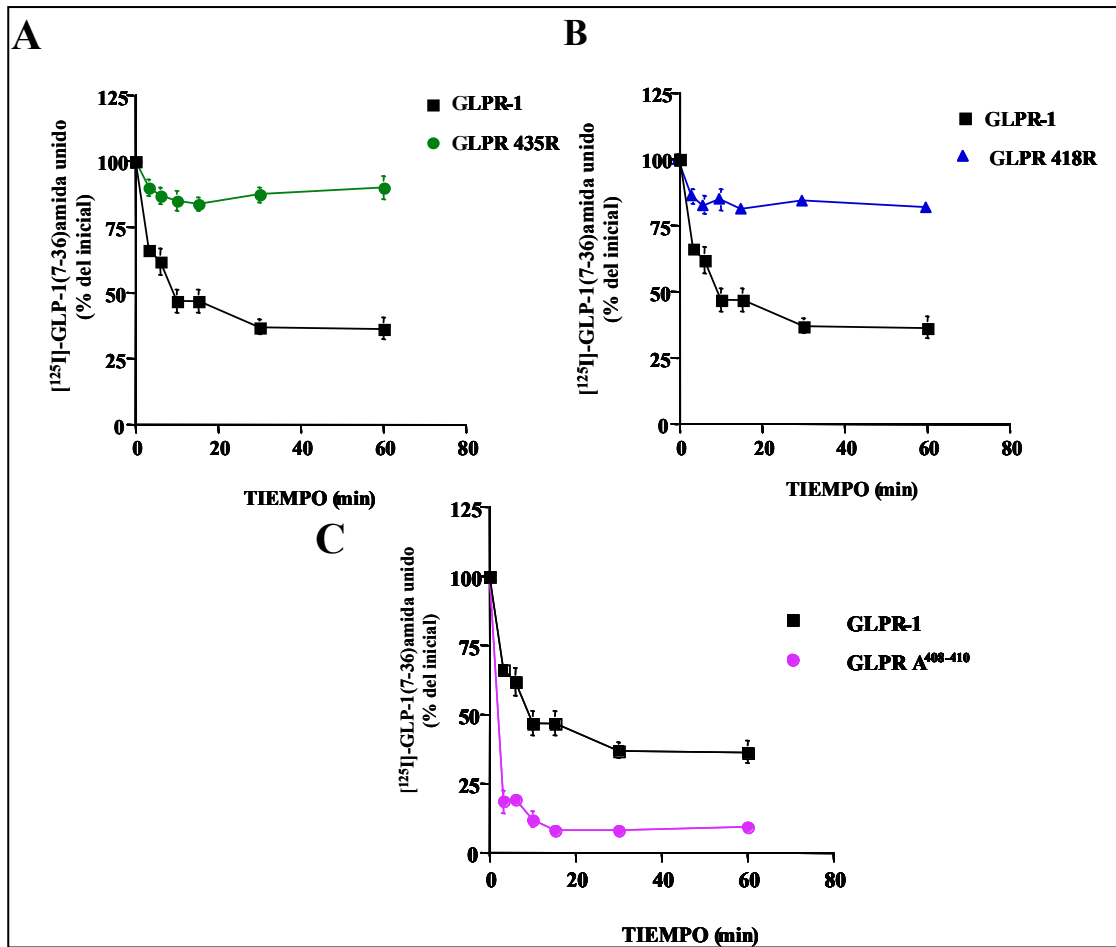


Figura 31.- Redistribución de los receptores mutados tras la estimulación continuada con 10 nM de GLP-1(7-36)amida. Las gráficas muestran el porcentaje de unión de ligando marcado a receptores en la superficie celular tras la preexposición al agonista, respecto a la unión previa al tratamiento. Los datos son la media \pm SEM de al menos 3 experimentos.

3.- CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE GLP-1 TRAS LA SUSTITUCIÓN DE LA CISTEÍNA EN POSICION 438 POR ALANINA

Muchos receptores acoplados a proteínas G contienen residuos de cisteína en el extremo carboxilo terminal que son, en muchos casos, sitios de acilación. El procesamiento postraduccionnal de estos receptores incluye la modificación de estos aminoácidos por tioesterificación con ácido palmítico lo que favorece la formación de un cuarto lazo intracitoplasmático, debido a la interacción de esta cadena hidrocarbonada con la membrana plasmática. Esta modificación del receptor permite la regulación de alguno de los fenómenos implicados en la señalización del mismo.

Con el fin de estudiar el efecto que la modificación de la cisteína en posición 438 del extremo carboxilo terminal podría producir en la señalización del receptor de GLP-1, se procedió a la sustitución de dicha cisteína por alanina mediante mutagénesis dirigida. El método de mutagénesis utilizado se explica con detalle en Materiales y Métodos. El receptor mutante obtenido se denominó GLPR A⁴³⁸.

Asimismo se realizó una delección en el receptor mutado en la cisteína, entre los aminoácidos 419-435, dando lugar a la eliminación de dos serinas en las posiciones 431/432, obteniéndose el receptor denominado GLPR 419Δ435 A⁴³⁸.

En la figura 32 se representa un esquema representativo del extremo C-terminal 408-463 de los receptores obtenidos tras proceso de mutagénesis.

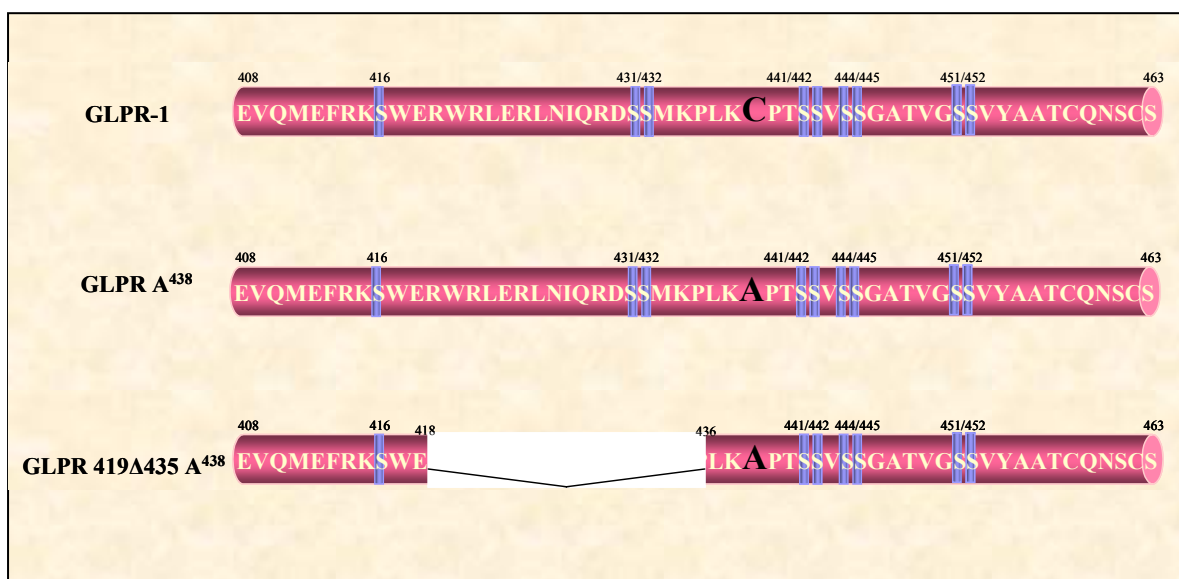


Figura 32.- Esquema representativo del extremo carboxi-terminal del receptor de GLP-1 y de los receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸

3.1.- Marcaje de las células con [³⁵S]-metionina y [³H]-palmítico

Con el fin de analizar si la cisteína en posición 438 es capaz de unir ácido palmítico realizamos ensayos de inmunoprecipitación, tanto en el receptor control unido al epítipo "tag" (tag GLPR-1) para su posterior reconocimiento con el anticuerpo, como en el mutado en la cisteína (tag GLPR A⁴³⁸) tras el marcaje de las células con [³⁵S]-metionina o con ácido palmítico tritiado. En la figura 33 se muestra el autorradiograma representativo de los experimentos de inmunoprecipitación con [³⁵S]-metionina, observándose una señal muy débil en ambos receptores tras cuatro días de exposición. El marcaje de las células con ácido palmítico fue indetectable.

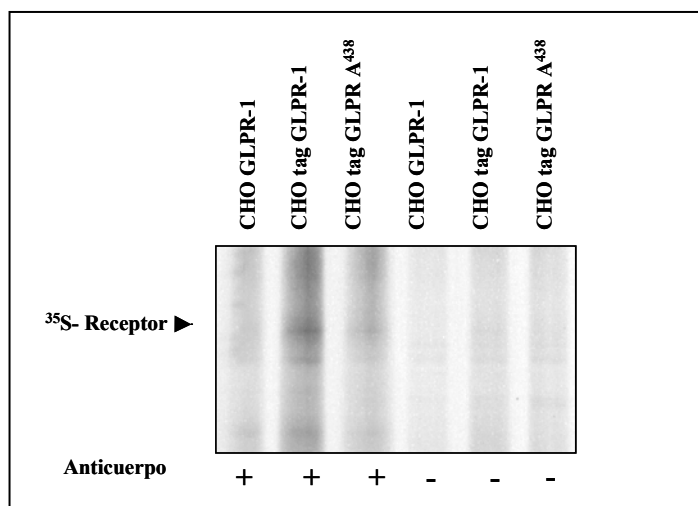


Figura 33.- Autorradiograma representativo de la inmunoprecipitación de receptores de GLP-1. El receptor control (tag GLPR-1) y mutado (tag GLPR A⁴³⁸) fueron marcados con [³⁵S]-metionina e inmunoprecipitados con el anticuerpo anti BIo M2 que reconoce el epítipo "tag". En la parte derecha se representa la unión inespecífica a la proteína agarosa-estreptavidina tras cuatro días de exposición.

3.2.- Efecto de las mutaciones en la interacción ligando-receptor

3.2.1.- Ensayos de desplazamiento de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida

De la misma manera que para el receptor de GLP-1 control, se realizaron experimentos de desplazamiento para determinar la afinidad de los receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ por su ligando y el número de receptores presentes en la membrana celular.

Las células CHO que expresaban GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ fueron sembradas en placas de 24 pocillos hasta una densidad de 5×10^4 células. Se estudió la especificidad de unión de cada uno de estos receptores a [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida realizando ensayos de competición utilizando concentraciones crecientes del péptido no radiactivo. Los resultados obtenidos de estos ensayos se representan en la figura 34 donde en el panel A observamos el porcentaje de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido frente a la concentración del ligando total.

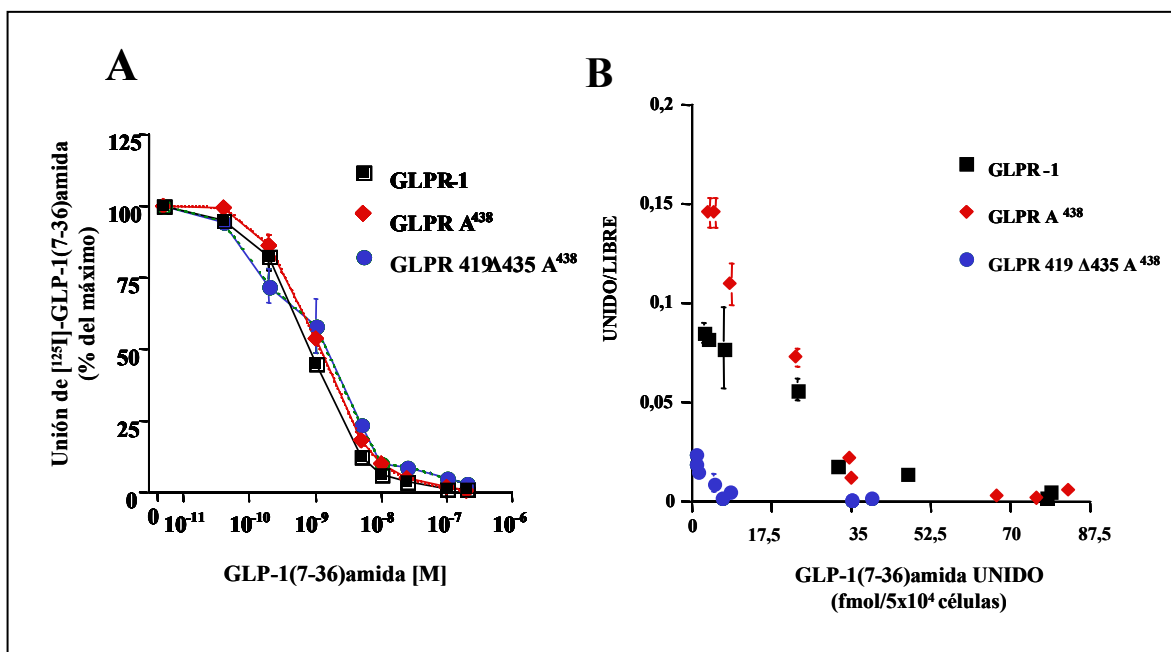


Figura 34.- Curvas de desplazamiento de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido a las células CHO transfectadas con los receptores GLPR-1, GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸. En el panel A se representa el porcentaje de ligando marcado que permanece unido a los receptores a diferentes concentraciones de GLP-1(7-36)amida. En el panel B, los análisis de Scatchard de los datos representados en el panel A de los diferentes receptores. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos.

El análisis de Scatchard de los datos (panel B) mostró que el cambio de la cisteína 438 por alanina, no modificó la afinidad del ligando por el receptor y el número de receptores fue muy similar al receptor control. La delección adicional del fragmento 419-435 dio lugar a modificaciones significativas en la afinidad, y en la capacidad de unión con respecto al receptor control. La tabla 3 refleja la constante de disociación y el número de receptores de las líneas celulares transfectadas con cada uno de estos receptores.

Tabla 3.- Datos resultantes de los análisis de Scatchard, realizados mediante el programa Ligand. Los resultados son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos.

	K_d [nM]	Bmax (fmol/5x10⁴células)
GLPR-1	1,6 \pm 0,611	67,8 \pm 6,4
GLPR A⁴³⁸	1,4 \pm 0,25	78,6 \pm 9,6
GLPR 419Δ435 A⁴³⁸	6,7 \pm 0,9	38,2 \pm 7,5

3.2.2.- Identificación de los complejos ligando-receptor

En la figura 35 se pueden observar los complejos [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida-receptor identificados por electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior autorradiografía, en las células que expresan los receptores control y mutados. Las masas moleculares de los receptores GLPR A⁴³⁸ y el GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸ fueron ligeramente mayores (70 kDa) a la del receptor control (68 kDa). En la parte derecha de la autorradiografía se aprecia la desaparición de dichos complejos, en presencia de 0,5 μ M de ligando no radiactivo.

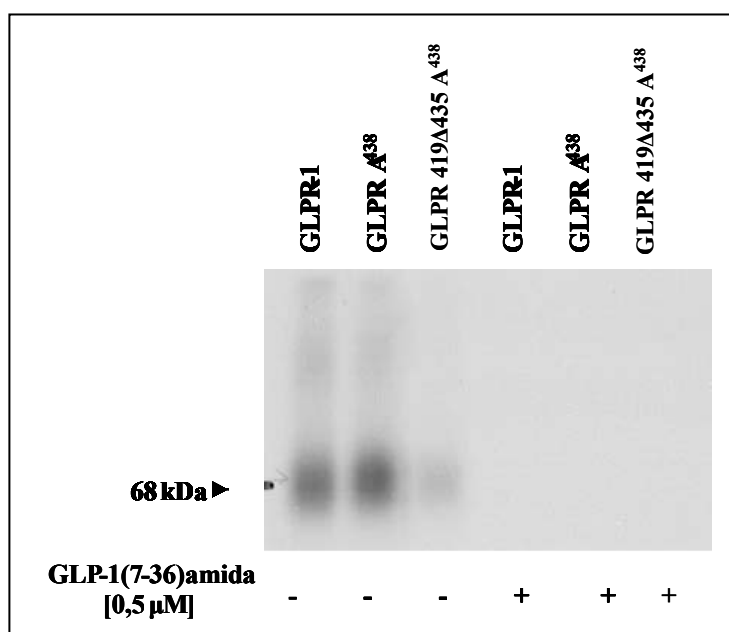


Figura 35.- Autorradiograma representativo de los experimentos de "cross-linking". Las diferentes bandas representan el complejo ligando marcado-receptor, para los receptores GLPR-1, GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸, en ausencia (-) o en presencia (+) de 0,5 μ M GLP-1(7-36)amida.

3.3.- Comparación de los mecanismos de transducción de señales entre los receptores mutados y control

3.3.1.- Producción de AMPc

Las células CHO transfectadas con los receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ fueron incubadas con diferentes concentraciones de GLP-1(7-36)amida entre 0,1 nM y 1 μM durante 15 minutos. En la figura 36, se observa una disminución drástica, de hasta un 80% de la producción de AMPc a 10 nM de GLP-1(7-36)amida, para los receptores mutantes estudiados respecto del control. En las células que expresan los receptores GLPR A⁴³⁸ se observó, que la producción de AMPc no fue dependiente de la concentración de GLP-1(7-36)amida en el rango de concentraciones estudiadas. En el GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ la producción de AMPc intracelular aumentó en función de la concentración de GLP-1(7-36)amida utilizada, pero en todas ellas la producción de AMPc obtenida fue significativamente menor que en el control siendo de solo un 16 % para la concentración de 10 nM de GLP-1(7-36)amida.

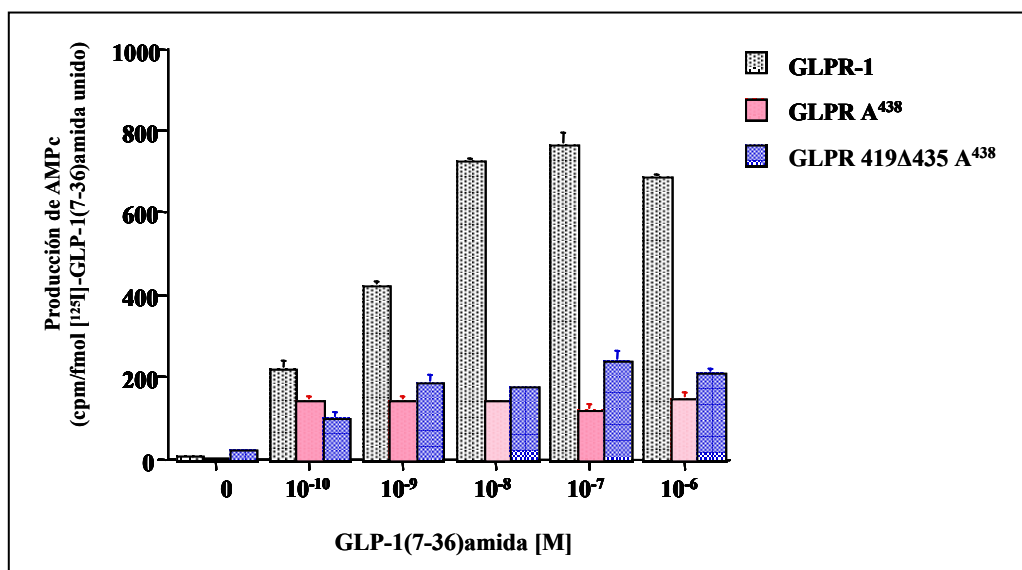


Figura 36.- Comparación de la actividad de la adenilato ciclasa en células que expresan receptores de GLP-1 control y mutados. Concentraciones intracelulares de AMPc por fmol de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido tras la estimulación con diferentes concentraciones de agonista. Los resultados representan la media ± SEM, n=3-5.

Para evaluar el efecto de la incubación previa con el ligando (desensibilización homóloga) las células fueron incubadas con 10 nM de GLP-1(7-36)amida durante 15 minutos y posteriormente tratadas con concentraciones crecientes del péptido comprendidas entre 0,1 nM y 1 μ M. En la figura 37 se representa el efecto de la incubación previa con 10 nM de GLP-1(7-36)amida sobre la producción de AMPc por las células que expresan receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸. En el caso del receptor GLPR A⁴³⁸ se observó una desensibilización tras el pretratamiento con 10 nM de GLP-1(7-36)amida detectable incluso a las concentraciones más bajas del péptido. La desensibilización fue más notable (panel B) en las células que expresan el receptor GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸ para el cual la estimulación previa con 10 nM de GLP-1(7-36)amida produjo una disminución en la producción de AMPc incluso a la concentración de 1 nM de GLP-1(7-36)amida.

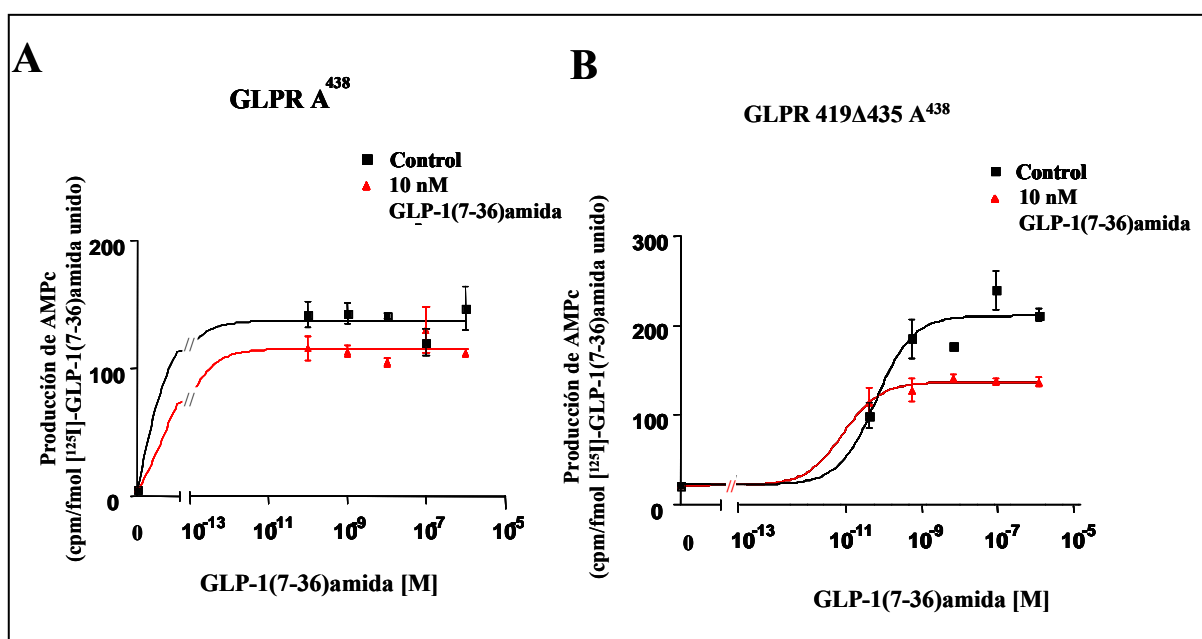


Figura 37.- Actividad de la adenilato ciclasa en células que expresan receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸. Producción de AMPc por fmol de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida unido tras la estimulación con diferentes concentraciones del agonista (■). Respuesta tras la estimulación previa con GLP-1(7-36)amida durante 15 minutos (▲). Panel A, CHO GLPR A⁴³⁸. Panel B, CHO GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸.

3.3.2.- Estimulación de la vía de señalización de las MAP quinasas

El grado de fosforilación de las proteínas ERK1/ERK2 en células CHO que expresan los receptores mutados GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ fueron analizadas por "Western blot", tras la incubación de dichas células con 10 nM de GLP-1(7-36)amida. Según se puede apreciar en la figura 38 la estimulación de esta vía fue dependiente del tiempo de incubación y el perfil de estimulación fue característico de cada una de las dos mutaciones. Para ambas, la fosforilación de ERK1/ERK2 fue máxima a los 10 minutos, pero en el caso de GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ la fosforilación de ERK1/ERK2 también se observó a tiempos mas largos (60 minutos). En el caso del GLPR A⁴³⁸, la fosforilación de dichas proteínas resultó ser efectiva hasta los 15 minutos y luego disminuyó a nivel basal de forma similar a lo observado para el receptor de GLP-1 control.

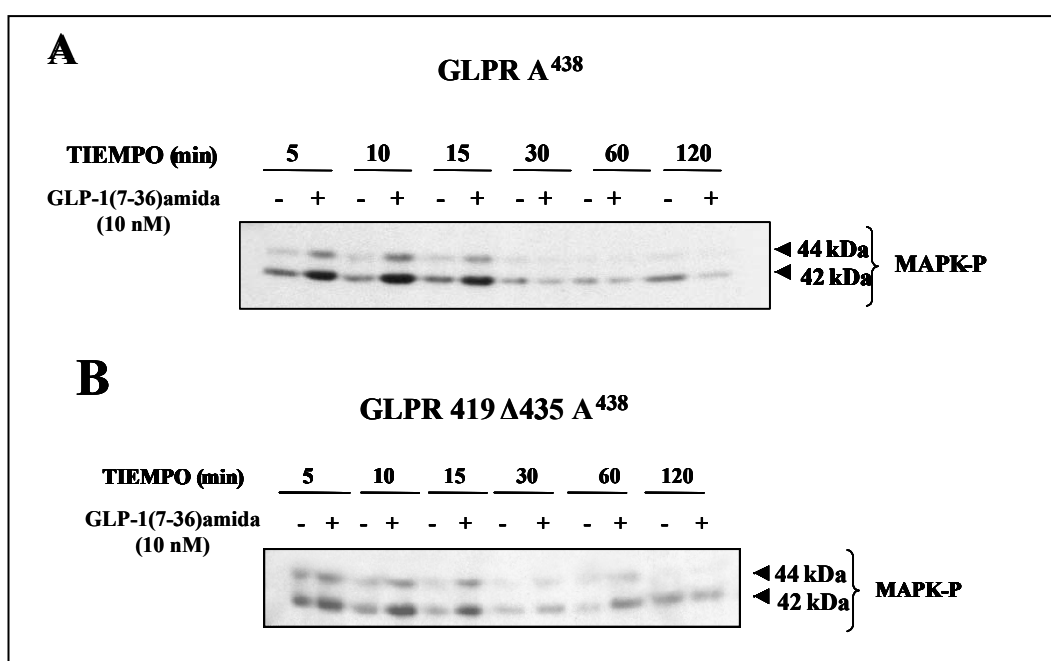


Figura 38.- Efecto del GLP-1 sobre la actividad MAP quinasa en células que expresan los receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸. En los paneles A y B se muestran los autorradiogramas representativos de la fosforilación de ERK1/ERK2 obtenida tras la estimulación con el agonista de los receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸.

3.4.- Cinética de endocitosis y redistribución

3.4.1.- Efecto de la sustitución de la cisteína 438 por alanina en la internación de los receptores

Las células CHO que expresan receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ se incubaron con [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida y se midió la radiactividad total y la radiactividad que permanece en el interior celular después del lavado ácido. Con estos datos se determinó la cantidad de receptores en la superficie celular a lo largo del tiempo mediante la diferencia entre la radiactividad total y la internalizada. Para estos dos receptores de GLP-1 mutados en la cisteína 438, el número de receptores en la superficie celular se mantuvo constante a lo largo del tiempo, según se indica en la figura 39 , cumpliendo así uno de los requisitos para poder utilizar el método de IN/SUR como medida de la tasa de endocitosis. En los dos casos el lavado ácido eliminó entre el 85-95% del ligando presente en la superficie celular al igual que para el receptor de GLP-1 control.

En ambos casos se observó un aumento lineal de la tasa de endocitosis hasta los 8 minutos. En las células que expresan los receptores GLPR A⁴³⁸ la tasa de endocitosis se incrementó un 10% respecto al control. La tasa de endocitosis fue un 90% más rápida en el receptor GLPR 419Δ435 A⁴³⁸. Las tasas de endocitosis de ambos receptores se han presentado en la tabla 4. Estos resultados indican que la secuencia de aminoácidos situadas entre los residuos 419-435, de la secuencia del receptor de GLP-1 interviene en la regulación negativa de la endocitosis.

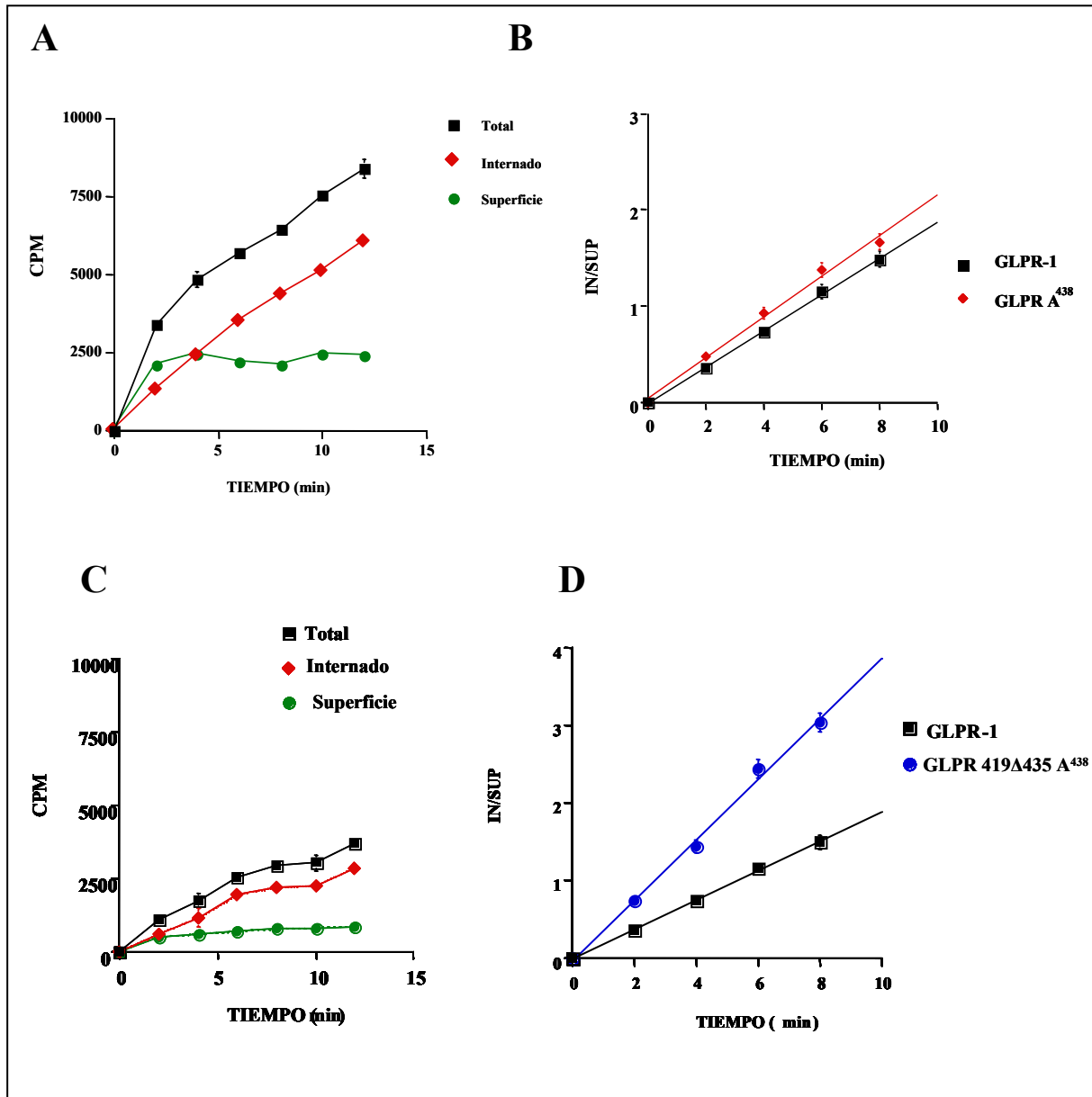


Figura 39.- Ensayos de endocitosis en las células CHO que expresan receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸. Las gráficas de los paneles A y C indican la cantidad de radiactividad específica encontrada, en la totalidad de la célula, (■) en la superficie (●) o en el interior celular (◆) en función del tiempo de incubación. Las gráficas de los paneles B y D, representan el cociente IN/SUP obtenido en función del tiempo de incubación a 37°C, para el receptor GLPR A⁴³⁸ (panel A y B) y el GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ (panel C y D).

Tabla 4.- Cuantificación de la tasa de endocitosis para los receptores GLPR-1, GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸. La tasa de endocitosis (constante de primer orden) fue calculada a partir de los datos de internación de [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amida. Los resultados representan la media ± SEM, n=8.

	Tasa de Endocitosis (min⁻¹)	% /control
GLPR-1	0,196 ± 0,0157	100
GLPR A⁴³⁸	0,217 ± 0,0062	111
GLPR 419Δ435 A⁴³⁸	0,373 ± 0,019	190

3.4.2.- Estudio del mecanismo de endocitosis de los receptores mutados

Al igual que para los receptores estudiados con anterioridad, se estudió el efecto de la utilización de medios hipertónicos y medios con inhibidores metabólicos en la tasa de endocitosis. Ambos tratamientos disminuyeron la tasa de endocitosis en las células con los receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ hasta valores muy similares a los obtenidos en las mismas condiciones para el receptor control. Estos resultados se representan en la figura 40.

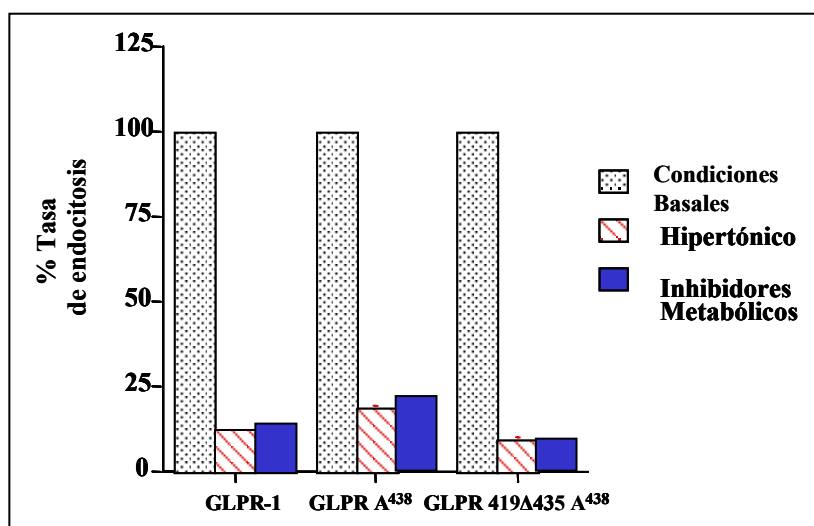


Figura 40.- Efecto del tratamiento con inhibidores metabólicos y con medio hipertónico sobre la tasa de endocitosis en las líneas celulares que expresan los receptores GLPR-1, GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸. Las tasas de endocitosis fueron calculadas como el porcentaje respecto a la tasa de endocitosis en condiciones basales tras el tratamiento con inhibidores metabólicos o medio hipertónico. Los resultados son la media ± SEM de al menos 3 experimentos.

3.4.3.- Ensayos de redistribución

Para estudiar el comportamiento de los receptores GLPR A⁴³⁸ y GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ presentes en la superficie celular tras una preestimulación con 10 nM de ligando, se comprobaron las variaciones del número de receptores en la superficie celular dependiente del tiempo de incubación. El perfil para el caso del receptor GLPR A⁴³⁸ fue muy similar al del receptor control, según se observa en la figura 41, de manera que a los 15 minutos se produjo una disminución del 55% de los receptores en superficie, que fue reduciéndose hasta alcanzar valores próximos al 26% a los 60 minutos de incubación.

En las células que expresan el receptor GLPR 419Δ435 A⁴³⁸ el porcentaje de unión específica en la superficie celular, a los 15 minutos de exposición con el agonista, fue un 35 % del inicial, y dicho porcentaje disminuyó de manera progresiva hasta un 20 %, a los 60 minutos del ensayo. De todos estos resultados se deduce que la eliminación del posible sitio de palmitoilación (cisteína 438) no provoca diferencias significativas en la interacción ligando-receptor ni en los procesos de endocitosis. Por lo tanto, las variaciones que se observaron en la endocitosis y en la redistribución del receptor GLPR 419Δ435 A⁴³⁸, pueden ser debidas a la eliminación de los aminoácidos entre los residuos 419-435.

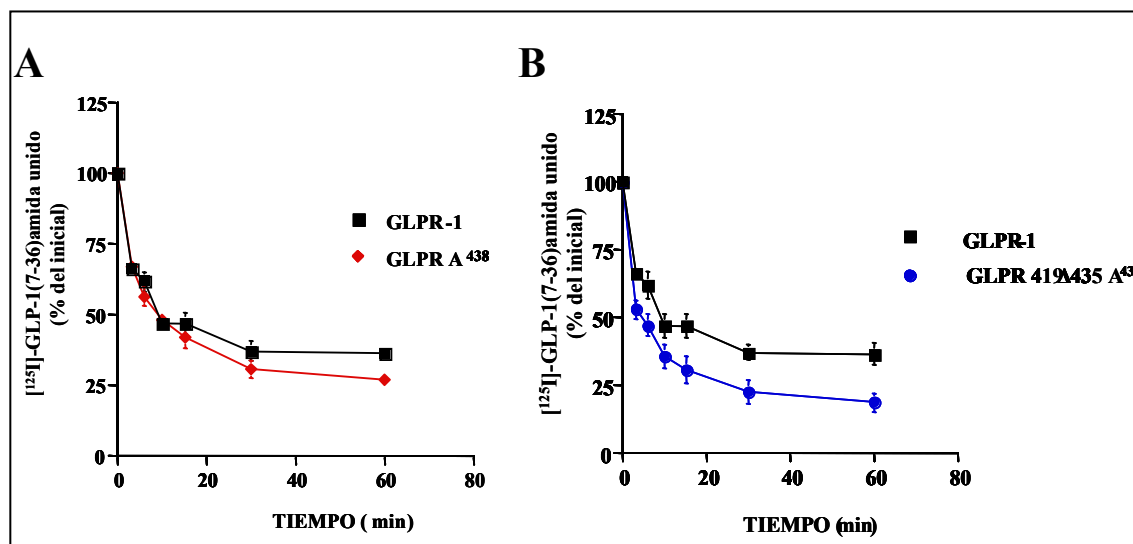


Figura 41.- Redistribución de los receptores mutados tras la estimulación continua con 10 nM de GLP-1(7-36)amida. Las gráficas muestran el porcentaje de unión de ligando marcado a receptores en la superficie celular tras la preexposición al agonista respecto a la unión previa al tratamiento. Los datos son la media \pm SEM de al menos 3 experimentos.

3.4.4.- Efecto del inhibidor específico de la PKC sobre la endocitosis

Debido a que en los procesos de endocitosis es importante la fosforilación del receptor, tratamos de estudiar la implicación de las quinasas intracelulares dependientes de segundos mensajeros (PKC y PKA), en los procesos de internación. Para ello utilizamos el inhibidor específico de la PKC (RO-318220) y el de la PKA (H-89).

Es conocido que la proteína quinasa C fosforila el receptor de GLP-1, pudiendo así influir en los procesos de endocitosis, según lo descrito para otros receptores. Los datos representados en la figura 41 reflejan que el inhibidor de la PKC produjo un aumento de la tasa de endocitosis de casi un 40% en el receptor de GLP-1 control. Por el contrario el inhibidor de la PKA no alteró la tasa de endocitosis del receptor control. El efecto del inhibidor de la PKC no se observó cuando eliminamos el fragmento del extremo carboxi-terminal del receptor de GLP-1 que contiene la mayoría de las serinas implicadas en procesos de fosforilación. En células que expresan el receptor GLPR 418R este tratamiento provocó una disminución de la tasa de endocitosis que no fue significativa, mientras que el inhibidor de la PKC produjo un ligero aumento del rango de internación en el caso del GLPR 435R.

Según los datos representados en esta figura 42, en presencia del inhibidor de la PKC la tasa de endocitosis aumentó de manera significativa (37%) para el receptor mutado en la cisteína 438, GLPR A⁴³⁸ y para el GLPR A^{431/432}, por el contrario con el GLPR 419Δ435A⁴³⁸, se produjo una disminución de la tasa de endocitosis por efecto de dicho inhibidor.

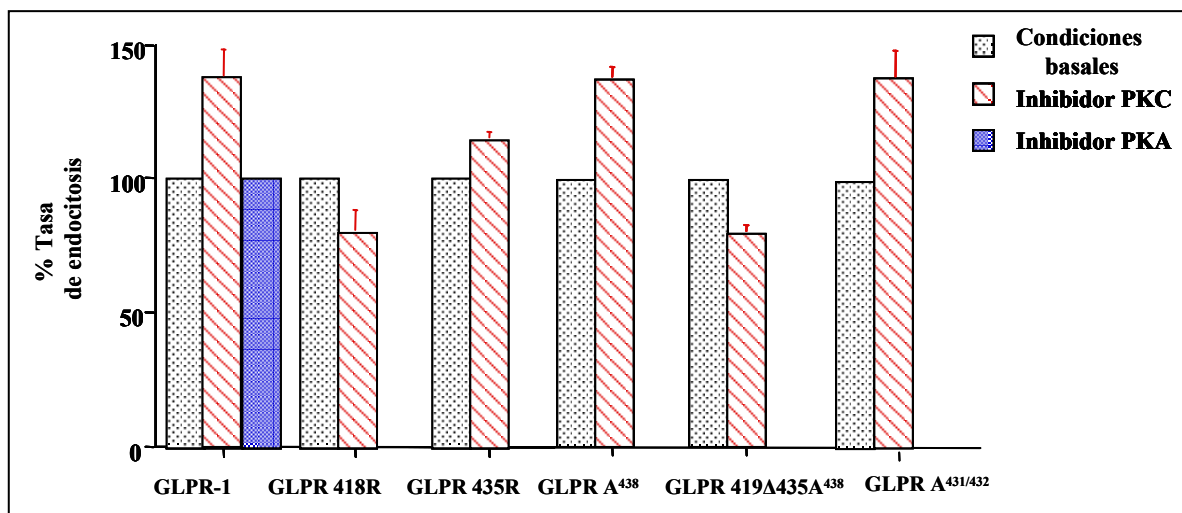


Figura 42.- Efecto de los inhibidores de PKC y PKA sobre la tasa de endocitosis. Se expresa el porcentaje de la tasa de endocitosis obtenida en presencia de los diferentes inhibidores, en función de los valores obtenidos en condiciones basales.

4.- ESTUDIOS DE FOSFORILACION

4.1.- Estudios de fosforilación "in vivo"

Con el fin de poder demostrar la relación entre los efectos observados en los procesos de endocitosis y señalización del receptor de GLP-1 y los fenómenos de fosforilación del receptor, realizamos ensayos de fosforilación *in vivo* con [³²P], para cada una de las líneas obtenidas de la transfección de células COS con los receptores tag GLPR-1, tag GLPR 418R, tag GLPR 435R, tag GLPRA⁴³⁸ y tag GLPR 419Δ435 A⁴³⁸. La inmunoprecipitación de dichos receptores se realizó con el anticuerpo anti Bio M2, que reconoce el epítipo "tag".

Debido a la baja capacidad de dicho anticuerpo para inmunoprecipitar los receptores de GLP-1, no obtuvimos unos resultados significativos del grado de fosforilación del receptor de GLP-1 bajo las diferentes condiciones.

4.2.- Estudios de fosforilación "in vitro"

Con el fin de determinar si todos los dobletes de serina del extremo citoplasmático pueden ser fosforilados por la PKC, obtuvimos proteínas de fusión formadas por la glutatión-S-transferasa y el fragmento del extremo C-terminal del receptor de GLP-1 control y correspondiente a cada mutante, según se describió en Materiales y Métodos. Se

realizaron ensayos de fosforilación de dichas proteínas de fusión y los resultados se muestran en la figura 43. En ella se observa que la PKC de cerebro de rata no fosforila a la glutathion-S-transferasa "*in vitro*", pero sin embargo fosforila a la proteína de fusión que contiene intacto el extremo carboxi-terminal del receptor de GLP-1 (GST-GLPR (406-463)), y su fosforilación es muy similar a la obtenida con la proteína que contiene una alanina en posición 438 de la secuencia del receptor de GLP-1 (GST-GLPR 406-463 A⁴³⁸). No se produjo fosforilación de las proteínas de fusión GST-GLPR 406-419Δ435 A⁴³⁸, ni de GST-GLPR 406-418R. Por todo ello se deduce que en ensayos "*in vitro*" la PKC necesita de los aminoácidos presentes entre los residuos 406-436 para fosforilar la proteína. Según se observa en la figura 43 la banda correspondiente a la GST-GLPR (406-435R), fue muy intensa, considerándose por tanto este fragmento como un buen sustrato para la PKC "*in vitro*".

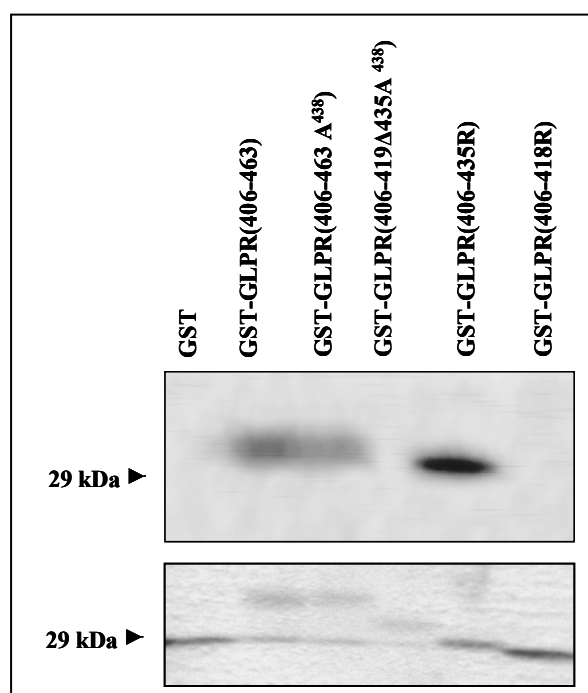


Figura 43.-Autorradiograma de la fosforilación "*in vitro*" por la PKC de las proteínas obtenidas por fusión de la GST con el fragmento C-terminal de los diferentes mutantes del receptor de GLP-1. En la parte superior se muestran las bandas correspondientes a las proteínas fosforiladas, mientras que en la parte inferior se muestra la cantidad utilizada de cada proteína de fusión para dicho proceso de fosforilación mediante tinción con azul comassie.

DISCUSIÓN

1.- SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1 CONTROL

El GLP-1(7-36)amida es un péptido regulador implicado en múltiples funciones tanto en tejidos periféricos como en el sistema nervioso central (SNC). Uno de sus efectos más importantes a nivel periférico es la estimulación de la secreción de insulina dependiente de glucosa por las células β pancreáticas (Thorens, 1992), así como la estimulación de la presión arterial y producción de surfactante pulmonar. A nivel central el GLP-1(7-36)amida estimula la liberación selectiva de neurotransmisores (Mora y cols., 1992) y participa en la regulación de procesos tales como la ingesta de alimentos y agua (Navarro, y cols., 1996), la temperatura corporal (O'Shea, y cols., 1996), y en el control ciertas funciones cardiovasculares (Barragán y cols., 1999). Puede tener también un papel como factor inductor de la diferenciación de ciertas células pancreáticas a células productoras de insulina (Hui, y cols., 2001). Todos estos efectos son mediados a través del receptor de GLP-1, por lo cual un mejor conocimiento de la estructura del receptor y sus interacciones con las moléculas efectoras podría ayudar a la comprensión de los mecanismos de transducción de señales inducidas por el péptido en los distintos tejidos.

El receptor de GLP-1 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, y como tal se caracteriza por tener siete dominios transmembranales, un dominio amino terminal extracelular, implicado en la unión al ligando y un dominio carboxilo terminal intracelular que participa y regula muchos de los procesos implicados en su internación y señalización. Se ha descrito que la interacción del tercer lazo citoplasmático del receptor de GLP-1 con las proteínas G heterotriméricas, es fundamental para la transducción y de señales llevadas a cabo por dicho receptor (Takhar, y cols., 1996).

La transducción de la señal a través de este receptor ocurre fundamentalmente mediante la estimulación de la vía de la adenilato ciclasa (Holtz, y cols. 1995) aunque también puede tener un papel importante la estimulación de la vía de las MAP quinasas, descrito más recientemente por Montrose-Rafizadeh y cols., en 1999.

En nuestro estudio se utilizaron células CHO para la transfección y posterior caracterización del receptor de GLP-1 y sus mutantes, y células COS para estudios más puntuales. En ambos tipos celulares pudimos estudiar los sitios de unión, número de receptores y afinidad del péptido por sus receptores. Cuando caracterizamos dicho receptor, observamos que en la membrana plasmática existe una forma glicosilada del receptor que es la única capaz de unir [125 I]-GLP-1(7-36)amida, de acuerdo con lo

descrito por Widmann y cols., en 1995, y que el complejo ligando-receptor en estas células posee una masa molecular de 68 kDa. El procesamiento del receptor puede variar de un tipo celular a otro, lo que explicaría que en cerebro el complejo ligando-receptor tenga una masa molecular de 56 kDa (Blázquez y cols., 1998).

La unión del agonista al receptor favorece el acoplamiento del mismo con las proteínas G y la activación de la adenilato ciclasa de manera dependiente de la dosis, provocando un aumento del AMPc como principal segundo mensajero de su acción. Las células CHO transfectadas con el receptor de GLP-1 nativo o control manifiestan capacidad para su desensibilización, de forma que tras una estimulación previa con el ligando se observó una disminución de la producción de AMPc, lo que se asemeja a lo descrito anteriormente por Widmann en 1997. Para este y otros receptores de la misma familia también se ha observado que el número de receptores expresados en las células es determinante ya que cuando las células expresan un elevado número de receptores apenas se aprecia desensibilización en la producción de AMPc (Widmann, y cols., 1996b; Whaley, y cols., 1994).

Otro de los efectos generados tras la unión del agonista al receptor de GLP-1 es la modificación del estado de fosforilación de los componentes de la vía de las MAP quinasas. No se conoce con detalle como se produce la activación de la vía de las MAP quinasas en el caso concreto del receptor de GLP-1. La activación por el agonista de las células CHO transfectadas con el receptor de GLP-1 incrementó las formas fosforiladas de las proteínas ERK1/ERK2, siendo la estimulación máxima a los 5 minutos. Estudios previos realizados en células RIN describieron un aumento de las formas fosforiladas de ERK1/ERK2 tras 30 minutos de estimulación con el agonista (Montrose-Rafizadeh y cols., 1999). En el caso del receptor de la hormona paratiroidea se ha descrito que la fosforilación de las formas ERK1/ERK2 fue máxima a los 10 minutos de estimulación con su ligando (Verheijen y Defize, 1997).

Después de la unión del agonista generalmente todos los receptores acoplados a proteínas G, sufren un proceso de internación necesario para evitar periodos de estimulación continuada y para favorecer la disponibilidad de nuevos receptores en la superficie celular (proceso conocido como resensibilización). Tras la interacción del complejo ligando-receptor con las proteínas G, el receptor es fosforilado por quinasas intracelulares, GRKs y otras quinasas. La fosforilación permite la interacción del receptor con las β -arrestinas, moléculas implicadas en los procesos de internación, lo que favorece el desacoplamiento del receptor de las proteínas G. Estos fenómenos de internación

ocurren de manera muy rápida y nuestros resultados están de acuerdo con los datos previamente descritos por Widmann y cols., 1995 para el caso concreto del receptor de GLP-1 cuyo tiempo medio de endocitosis fue de 2-3 minutos.

2.- EFECTO DE LAS DELECCIONES REALIZADAS EN EL EXTREMO CARBOXILO-TERMINAL DEL RECEPTOR DE GLP-1 SOBRE SU SEÑALIZACIÓN

En los receptores acoplados a proteínas G existen determinadas regiones en su extremo carboxilo terminal que pueden regular los procesos de internación y señalización del receptor. Algunos de estos procesos están regulados por fosforilación de determinados residuos de serina o treonina, debido a la acción de quinasas intracelulares, ya sean quinasas de los receptores acoplados a proteínas G o quinasas dependientes de segundos mensajeros.

Para el estudio de las regiones implicadas en la señalización del receptor de GLP-1, realizamos una serie de deleciones en el extremo carboxilo terminal, de manera que eliminamos diferentes aminoácidos. En el mutante GLPR 435R, se suprimieron los últimos 27 aminoácidos entre los que se encuentran los dobles de serina 441/442 , 444/445 y 451/452. En el mutante GLPR 418R, se deleccionaron los últimos 44 aminoácidos del extremo carboxilo terminal del receptor, eliminando además el doblete de serina situado en la posición 431/432. Por otro lado se estudió el efecto sobre la señalización del receptor de GLP-1 de la mutación por alaninas de tres aminoácidos próximos a la última región transmembrana (EVQ), que están conservados en muchos miembros de esta subfamilia.

Las células transfectadas con los receptores GLPR 418R y GLPR 435R, expresaron un número muy similar de receptores en la superficie celular y algo inferior al expresado por las células transfectadas con el receptor control. No se observaron diferencias significativas entre las constantes de afinidad del GLP-1(7-36)amida por los receptores mutantes o el control. Las células transfectadas con el mutante GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ expresaron un número muy bajo de receptores, hasta el punto que no fue posible realizar la caracterización de este mutante.

Cuando visualizamos mediante experimentos de “cross-linking” la movilidad electroforética de los complejos ligando-receptor, se pudieron apreciar ligeras diferencias, que no se corresponden con la diferencia en el número de aminoácidos deleccionados y

que posiblemente sean debidas también a diferencias en el grado de fosforilación presentada por cada uno de los diferentes mutantes estudiados.

La unión del agonista al receptor promueve la interacción de este último con proteínas G y la activación de la adenilato ciclasa y de la vía de las MAP quinasas. En las células que expresan los receptores con deleciones en el extremo carboxilo terminal (GLPR 418R y GLPR 435R), se detectó una mayor producción de AMPc a bajas concentraciones del agonista, pero a concentraciones más altas la respuesta fue similar a la obtenida para el receptor control. Estos resultados están en concordancia con lo descrito anteriormente para el tercer lazo del receptor que es la región implicada en la interacción con las proteínas G y posterior activación de la adenilato ciclasa (Hällbrink, y cols., 2001). Resultados similares han sido descritos para el receptor de CCK, cuyas deleciones en residuos de serinas y treoninas en el extremo carboxilo-terminal no modificaron la señalización del receptor (Go, y cols., 1998).

Los fenómenos de desensibilización son muy importantes en la regulación de la señalización promovida por la unión de un ligando a su GPCRs. La desensibilización del receptor ya sea homóloga o heteróloga, puede ser debida a la acción de GRKs o bien a quinasas dependientes de segundos mensajeros (PKA y PKC) que promueven la fosforilación del receptor, la interacción con β -arrestinas y el desacoplamiento de las proteínas G. En los mutantes GLPR 418R y GLPR 435R, la estimulación previa con el agonista no produjo desensibilización de los receptores, lo que puede ser debido a la eliminación de serinas, que son sustratos para la acción de las quinasas y están directamente implicadas en los fenómenos de desensibilización (Widmann, y cols., 1997).

Con el mutante del receptor de GLP-1, GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰, en ausencia del agonista la producción basal de AMPc fue muy elevada en relación con los datos obtenidos con el receptor control, y estos valores no se modificaron tras la estimulación con diferentes concentraciones del agonista, indicando inequívocamente que la unión del agonista a estos receptores no estimuló la síntesis de AMPc.

Otra de las vías de señalización que están acopladas al receptor de GLP-1 es la ruta de las MAP quinasas (Montrose-Rafizadeh, y cols. 1999). Por ello, nosotros hemos estudiado la modificación del estado de fosforilación de las formas ERK1/ERK2 tras el tratamiento con GLP-1(7-36)amida. En las células que expresaban los receptores GLPR 418R y GLPR 435R la señal máxima se observó a los 15 minutos de estimulación, con un retraso significativo en relación con el efecto observado en las células, con el receptor de GLP-1 nativo, en las que la máxima señal se observó a los 5 minutos. Para las células que

expresaron el receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ la estimulación de la vía de las MAP quinasas fue casi indetectable en función del tiempo, aunque los valores basales fueron muy elevados, al igual que ocurrió con la formación de AMPc. Es posible que estos receptores sean activos constitutivamente, incluso en ausencia del agonista. Para algunos GPCRs se ha descrito que la estimulación de las proteínas implicadas en esta cascada de señalización vía MAPKs requiere el acoplamiento del complejo ligando-receptor con alguna de las proteínas que facilitan el proceso endocítico, como es la arrestina para algunos receptores como el β -adrenérgico y el muscarínico de tipo 1 (Barlic y cols., 2000), o bien la dinamina para otros como el receptor opioide (Whistler y Van Zastrow, 1999).

La internación de los complejos ligando-receptor es importante para la señalización de muchos receptores, así como para la disociación del complejo ligando-receptor y la resensibilización del receptor. Cuando un GPCRs es estimulado por el agonista, las GRKs pueden fosforilar residuos de serina del extremo carboxilo terminal y esta fosforilación favorece el acoplamiento con las β -arrestinas, moléculas implicadas en los procesos de endocitosis. Se ha visto que en el caso del receptor GLPR 435R (en el que se eliminan 27 aminoácidos del extremo C-terminal) no se produce prácticamente endocitosis. Esta región contiene secuencias ricas en serinas que han sido identificadas como señales endocíticas en otros receptores de la misma familia, como el receptor de la colecistoquinina (CCK) (Go, y cols., 1998) y el receptor de la hormona paratiroidea (Huang, y cols., 1995a).

Nuestros resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por Widmann en 1997, quién mostró que la sustitución de 3 dobles de serina por alaninas en las posiciones 441/442, 444/445 y 451/452 del extremo C-terminal del receptor de GLP-1, suprime la fosforilación promovida por el agonista e inhibe el proceso de endocitosis. Sin embargo en las células que expresaron el receptor GLPR 418R, en el que además se eliminan las serinas situadas en posición 431/432, la tasa de endocitosis fue un 30% superior a la del receptor GLPR 435R. Esto sugiere que en el extremo C-terminal del receptor existen secuencias que regulan de manera positiva y negativa el proceso de endocitosis, como se ha descrito para el receptor de la hormona paratiroidea (Huang, y cols., 1995b). La importancia del doblete de serina 431/432 fue analizado también de forma independiente sustituyendo ambos residuos por alaninas. Estas sustituciones no afectaron a la tasa de endocitosis. La importancia de otras secuencias del extremo C-terminal fue también confirmada por los datos obtenidos con el receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ en el cual las mutaciones por alanina de los residuos 408-410 en la región proximal a la

membrana, aumentó un 196% la tasa de endocitosis sobre la del receptor control. Resultados similares fueron descritos para un mutante de la misma secuencia del receptor de la hormona paratiroidea (Huang, y cols., 1995a), aunque en dicho receptor esta mutación produjo solo un aumento del 40 % de la tasa de endocitosis.

Las diferencias encontradas en la tasa de endocitosis, también se observaron en la redistribución promovida por el agonista. Las células que expresaron receptores GLPR control presentaron en su superficie un 40 % de los receptores iniciales a los 15 minutos de exposición con el agonista. Por el contrario las células que expresaron receptores GLPR 418R y GLPR 435R, mantuvieron a los 15 minutos un 85% de la totalidad de los receptores iniciales en su superficie, mientras que las células transfectadas con el mutante GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ expresaron solo un 10% de los receptores tras 15 minutos de estimulación con el agonista. Nuestros resultados sugieren que en general existe una relación directa entre endocitosis y pérdida de receptores en superficie promovida por la presencia de agonista. La excepción son las células que expresan receptores GLPR 418R, que mantienen un número de receptores en superficie mas elevado del que esperaríamos en función de su tasa de endocitosis, confirmando la propuesta de que en general el proceso de reciclaje de receptores es una ruta no regulada como se había sugerido con anterioridad (Mayor, y cols., 1993).

Nuestros resultados también sugieren que la producción de segundos mensajeros no es la señal que inicia el proceso de internación en el caso del receptor de GLP-1, como se había propuesto tras analizar el efecto que promueve el antagonista del receptor de GLP-1 exendina (9-39), que no induce la producción de AMPc y no produce internación del receptor (Widmann, y cols., 1995). Nuestros resultados indican que la estimulación de la síntesis de segundos mensajeros y la internación del receptor son procesos independientes y de esta forma el receptor GLPR 435R es capaz de estimular la producción de AMPc y es deficiente en endocitosis y el receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ no promueve la síntesis de segundos mensajeros pero se interna rápidamente. Nuestros resultados están de acuerdo con los datos obtenidos con el receptor β -adrenérgico (Cheung, y cols., 1990) y el receptor de angiotensina (Hunyady, y cols., 1994) que sugieren que no hay una interdependencia entre la estimulación de proteínas G y el proceso de endocitosis.

Se ha descrito también para otros receptores que existe una relación entre los procesos de endocitosis y la señalización vía MAP quinasas como es el caso de el receptor β -adrenérgico, en el que es necesaria la endocitosis mediada por vesículas recubiertas de

clatrina para la activación de las MAP quinasas (Vogler, y cols., 1999). En nuestros resultados se observa que existe un retraso en la activación de las formas fosforiladas ERK1/ERK2 para las células que expresan receptores GLPR 435R y GLPR 418R cuya tasa de endocitosis es inferior a las del receptor control. En cambio para el receptor GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ no se aprecia prácticamente una estimulación de dicha vía dependiente del tiempo, aunque no podemos excluir que debido a su alta tasa de internación, la estimulación tenga lugar a tiempos inferiores a los cinco minutos.

Algunos receptores acoplados a proteínas G pueden internarse en las células a través de vesículas recubiertas. Esta vía de endocitosis es utilizada por la mayoría de los receptores, tanto con una sola región transmembrana como muchos de los receptores acoplados a proteínas G (Peeler, y cols., 1993). En otros casos se ha identificado una segunda vía que no está mediada por vesículas recubiertas de clatrina, habiéndose sugerido que puede favorecer el rápido reciclamiento de estos receptores a la membrana (Sandvig, y van Deurs, 1991; Lamaze, y Schmid, 1995). Algunos de los mutantes que hemos descrito se internan en las células a pesar de carecer de una de las regiones que pueden promover la interacción con las β -arrestinas y por lo tanto favorecer la endocitosis de estos receptores a través de vesículas recubiertas de clatrina. Para estudiar si estos receptores entran en la célula a través de otra ruta analizamos el efecto de inhibidores metabólicos y de un medio hipertónico que provoca la ruptura del enrejado de clatrina. El tratamiento con este último produjo una disminución de la tasa de endocitosis similar a la observada en presencia de inhibidores metabólicos en células que expresaron los receptores GLP-1 control, GLPR 435R, GLPR A⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ y GLPR A^{431/432}, por lo que se deduce que la mayor parte de estos receptores se internan vía vesículas recubiertas de clatrina. El tratamiento con inhibidores metabólicos solo disminuyó un 40% la tasa de endocitosis en células con receptores GLPR 435R y en un 60% de células que contenían receptores GLPR 418R. Estos datos se deben en parte, al mayor error del cálculo de la tasa de endocitosis en estas células ya que el lavado ácido solo elimina un 85-95% de la unión en superficie en todas las líneas celulares estudiadas e indicaría que en estos casos la tasas serían aún menores. Otra explicación es que un porcentaje de estos receptores entren en las células por un mecanismo que no necesita aporte de energía.

Sin embargo en las células con receptores GLPR 418R, el efecto del tratamiento hipertónico y el de los inhibidores metabólicos fue diferente. En el caso de este mutante parte de los receptores que cuantificamos como intracelulares no entran en las células vía vesículas recubiertas de clatrina, ya que la rotura del enrejado de clatrina con el medio

hipertónico produjo una disminución de la tasa de endocitosis menor que la obtenida con inhibidores metabólicos. El mismo efecto se ha observado en mutantes de la hormona paratiroidea en el que se había eliminado casi la totalidad del extremo carboxilo terminal (Huang, y cols., 1995a). La internación a través de vesículas no recubiertas de clatrina como se ha descrito para el receptor de la CCK (Roettger, y cols., 1995) favorecería el reciclaje de los receptores a la membrana de una manera más rápida. Esto concuerda con los resultados obtenidos por nosotros en los experimentos de redistribución, en los que para el mutante GLPR 418R, el número de receptores que encontramos en la superficie celular, fue mayor de lo que se esperaría por su tasa de endocitosis; asimismo nuestros datos indican que la internación a través de vesículas no cubiertas de clatrina favorece un reciclaje más rápido para algunos receptores.

3.- EFECTO DE LA MODIFICACIÓN DEL POSIBLE SITIO DE PALMITOILACIÓN EN LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1

El efecto de la modificación del posible sitio de palmitoilación en el receptor de GLP-1 se estudió tras la sustitución de la cisteína en posición 438 por alanina. Esta cisteína se conserva también en el receptor de GLP-1 humano. Como ya se ha explicado en la introducción, algunos receptores acoplados a proteínas G contienen en su secuencia, generalmente en la región proximal a la membrana en su extremo carboxilo terminal, residuos de cisteína que son susceptibles de sufrir procesos de acilación por tioesterificación (Bouvier, y cols., 1995). Esta clase de modificación por acilación es un mecanismo de regulación importante en algunos receptores como el receptor β -adrenérgico, (O'Dowd, y cols., 1989), el de vasopresina (Hawtin, y cols., 2001), el de bradiquinina (Pizard, y cols., 2001) y otros, ya que esta modificación permite la formación de otro lazo intracelular por la interacción del ácido palmítico con la membrana plasmática, modificando la conformación del extremo C-terminal del receptor y por lo tanto, favoreciendo en algunos casos una modificación en la señalización del mismo. El proceso de acilación es además un proceso dinámico y en algunos casos como en el receptor de serotonina, se induce tras la unión del agonista (Ponimaskin, y cols., 2001). Sin embargo, se ha sugerido para éste y otros receptores (β -adrenérgico y dopamina) que la estimulación de manera prolongada puede disminuir la capacidad de unir ácido

palmítico a dicho receptor. Por lo tanto los ciclos de palmitoilación/depalmitoilación podrían estar regulados por la unión del agonista al receptor.

Para analizar la incorporación de ácido palmítico al receptor de GLP-1 tratamos de inmunoprecipitar los receptores control y GLPR A⁴³⁸, con diferentes anticuerpos, tras el marcaje de las células con [³⁵S]-metionina y [³H]-palmítico. El marcaje con [³⁵S]-metionina indicó que los anticuerpos que utilizamos fueron poco eficaces para inmunoprecipitar el receptor de GLP-1, observándose una débil señal después de cuatro días de exposición tanto para el receptor control como para el mutado en la cisteína. En el caso del marcaje con [³H]-palmítico, no pudimos detectar señal alguna en ninguno de los dos receptores. Teniendo en cuenta la baja eficiencia de los anticuerpos utilizados y que es difícil detectar marcajes con tritio, concluimos que estos experimentos no fueron resolutivos y se necesitaría un anticuerpo mas específico para realizar este tipo de estudios.

En el receptor de GLP-1 sustituido en la cisteína en posición 438 por alanina, apenas varió la capacidad de unión al ligando respecto del receptor control, por lo que se deduce que esta mutación no afecta a la conformación del receptor. Los receptores se expresan en la membrana y mantienen su afinidad por el ligando de manera similar al receptor control.

La capacidad de unión del ligando por el receptor tampoco ha sido modificada en otros receptores de esta familia, deficientes en palmitoilación como es el caso del receptor de vasopresina (Schulein, y cols., 1996), de la hormona luteinizante (Kawate, y Menon, 1994), de la hormona liberadora de tirotropina (Nussenzveig, y cols., 1993), y del receptor β adrenérgico (Tanaka, y cols., 1998).

Una de las diferencias en el comportamiento del receptor mutante se observó al analizar la movilidad electroforética de los complejos ligando-receptor. Así, los complejos ligando-GLPR A⁴³⁸ presentaron una menor movilidad electroforética en comparación al complejo ligando-receptor control. Un efecto similar fue descrito para las proteínas mutantes deficientes en palmitoilación de p21^{Nras} (Magee, y cols., 1987) y el receptor β -adrenérgico (O'Dowd, y cols., 1989)

Según los estudios realizados para otros miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, la variación en el estado de palmitoilación del receptor puede provocar cambios en la internación y señalización mismo. Al igual que los estudios

realizados en el receptor deleciónado en su extremo carboxilo terminal, se llevaron a cabo ensayos para caracterizar el efecto de la modificación de dicha cisteína del receptor de GLP-1 en los procesos de señalización, por las vías, de la adenilato ciclasa y las MAPKs. En el caso del receptor de GLP-1 la sustitución de la cisteína en posición 438 por alanina disminuyó de manera significativa la producción de AMPc cuando dicho receptor fue estimulado por su agonista. Se ha descrito previamente que determinadas regiones en el tercer lazo citoplasmático del receptor de GLP-1 son las responsables del acoplamiento con las proteínas G (Wheeler, y cols., 1993). Nuestros resultados sugieren que el extremo carboxilo terminal puede regular, bien la interacción y activación o la estabilidad del acoplamiento con las proteínas G.

La disminución en la producción del AMPc cuando se estimula el receptor GLPR A⁴³⁸ con su ligando GLP-1(7-36)amida, podría explicarse por los cambios conformacionales provocados al interactuar o no el ácido palmítico con la membrana alterando la estructura del extremo C-terminal del receptor. Los efectos de la modificación de sitios de palmitoilación en otros receptores es contradictoria, y en algunos casos afecta a la interacción con proteínas G como el β -adrenérgico (Strader, y cols., 1987; Moffet, y cols., 1996). Por el contrario en el caso del receptor de vasopresina, deficiente en palmitoilación no existe variación en la producción de AMPc (Schülen, y cols., 1996), al igual que en el receptor de la hormona liberadora de tirotropina (Tanaka, y cols., 1998). Los receptores GLPR A⁴³⁸ mantuvieron su capacidad de desensibilización homóloga tras el tratamiento previo con el agonista.

En la mayoría de los casos la eliminación del cuarto lazo intracitoplasmático que se produce por la unión del ácido palmítico con la membrana, puede modificar el acceso de las quinasas que catalizan la fosforilación de las serinas y treoninas del extremo carboxilo terminal. Así, en el caso del receptor β -adrenérgico deficiente en palmitoilación, se produce un aumento de fosforilación basal incluso en ausencia de agonista (Moffet, y cols., 1993). En el caso del receptor de adenosina A₃AR (Palmer y Stiles, 2000) el cambio en la palmitoilación incrementa la accesibilidad de las quinasas que fosforilan al receptor, siempre en presencia del agonista.

La vía de las MAPKs, también se vio alterada en nuestro mutante GLPR A⁴³⁸ ya que la fosforilación máxima de las formas ERK1/ERK2 fue a los 10 minutos de la estimulación del receptor con el GLP-1(7-36)amida, en lugar de los 5 minutos del receptor control.

La palmitoilación puede jugar por lo tanto un papel importante en la regulación de la accesibilidad de otras proteínas reguladoras a los dominios del receptor próximos al sitio de palmitoilación y puede alterar también los procesos de internación de estos receptores (Morello, y cols., 1996). En el receptor GLPR A⁴³⁸ la tasa de endocitosis fue ligeramente superior al receptor control, aunque las diferencias no fueron significativas. Resultados similares fueron obtenidos para los receptores β y α -adrenérgicos (Eason, y cols., 1994; Campbell, y cols., 1991), y para el receptor de vasopresina (Sadeghi, y cols., 1997), en los cuales la ausencia de palmitoilación no cambia su tasa de endocitosis. En el caso de los receptores LH/hCG (Kawate, y Menon, 1994), y de bradiquinina (Pizard, y cols., 2001) la ausencia de palmitoilación aumentó la tasa de endocitosis. Sin embargo, el receptor no palmitoilado de TRH tuvo una tasa de internalización mas baja (Nussenzveig, 1993).

Para estudiar si la sustitución de la cisteína 438 puede modificar la capacidad de fosforilación por quinasas intracelulares en residuos próximos a dicha cisteína, se realizaron varias aproximaciones ya que las células que expresan receptores GLPR A⁴³⁸ son todavía susceptibles de sufrir desensibilización promovida por el agonista, fenómeno en el que están implicados los dobletes de serinas 441/442, 444/445 y 451/452. Se realizó una delección entre los aminoácidos 419-435, fragmento que contiene el doblete de serina 431/432, obteniéndose así el mutante del receptor de GLP-1 denominado GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸. Esta delección nos permitió también confirmar que este fragmento tiene efecto inhibitorio de la endocitosis en receptores que mantienen los sitios de fosforilación por GRKs. En las células que expresaron estos receptores la producción de AMPc fue menor respecto del receptor control y similar al mutante en la cisteína. Además el receptor GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸ fue capaz de sufrir fenómenos de desensibilización tras la estimulación con el agonista de manera similar a lo observado para el receptor mutado únicamente en la cisteína. Las células que expresan estos receptores tienen una tasa de endocitosis muy alta, por lo que se deduce que entre los residuos 419-435 existen señales inhibitorias para el proceso de la internación del receptor una vez estimulado por el agonista, y que este proceso es independiente de la posible modificación por palmitoilación. Aunque dicho fenómeno podría ser atribuido a la eliminación del doblete de serina localizado en la posición 431/432, como ya se indicó anteriormente la sustitución de dichas serinas por alaninas no alteró la tasa de endocitosis del receptor.

Del mismo modo que en los receptores modificados mediante delecciones del extremo carboxilo terminal para los receptores con la mutación en la cisteína 438,

realizamos ensayos de endocitosis con diferentes tratamientos. En ninguno de estos mutantes se observó variación de la endocitosis por el tratamiento hipertónico y con inhibidores metabólicos, por lo que se dedujo que la mayor parte de los receptores se internalizan vía vesículas recubiertas de clatrina.

4.- ESTUDIOS DE FOSFORILACIÓN

Los procesos de desensibilización homóloga del receptor de GLP-1 mediante fosforilación inducida por unión del agonista son responsables de los fenómenos de endocitosis. Dicha fosforilación tiene lugar en residuos de serina del extremo carboxilo terminal del receptor lo que favorece la asociación del receptor con la β -arrestina.

Los fenómenos de desensibilización heteróloga, son debidos a la acción de quinasas intracelulares generalmente de manera independiente de la unión del agonista al receptor y suele estar mediada por la acción de la PKC y la PKA. Widmann en 1997, describió que el receptor de GLP-1 no es sustrato para la PKA; por el contrario la PKC es capaz de fosforilar el receptor de GLP-1 y el doblete de serina situado en posición 431/432 es uno de los sitios que se ajusta a las preferencias de la PKC. No ocurre lo mismo con los dobletes 441/442, 444/445 y 451/452 aunque también pueden ser fosforilados pero con menor intensidad en células COS y CHL. Estos dobletes 441/442, 444/445 y 451/452, son los sitios de fosforilación por GRKs tras la unión del agonista y está descrito que su fosforilación promueve endocitosis.

Los anticuerpos de los que disponemos no nos permiten inmunoprecipitar el receptor de GLP-1 para estudiar su estado de fosforilación "*in vivo*". Los experimentos de fosforilación "*in vitro*" indicaron que en estas condiciones solamente aquellas proteínas de fusión que contiene los residuos del 408-436 presentan un alto nivel de fosforilación por la PKC. Otra explicación a estos resultados es que la PKC no pueda interaccionar con el extremo C-terminal del receptor de GLP-1 en ausencia de los residuos 419-435. Por resultados previos sabemos que la especificidad para esta quinasa puede ser diferente "*in vivo*" e "*in vitro*" (Widmann, y cols., 1996a).

Los datos publicados acerca de la fosforilación por PKC y su efecto en el proceso de endocitosis son contradictorios, ya que por una parte se indica que la PKC puede fosforilar las serinas 441/442, 444/445 y 444/446, pero la estimulación de la PKC no incrementa la tasa de endocitosis en ausencia del agonista. Por otra parte las GRKs fosforilan estos mismos residuos pero también promueven la rápida internación de los

receptores. Con el fin de relacionar el efecto que la fosforilación de la PKC tiene sobre los procesos de endocitosis realizamos experimentos de internación inhibiendo la PKC con el inhibidor específico RO-318820 y la PKA con el inhibidor H-89. El tratamiento de las células que expresaban el receptor control con el inhibidor de la PKC, produjo un aumento de la tasa de endocitosis, lo cual podría explicarse porque la fosforilación inducida por la unión del agonista se potencia en presencia del inhibidor de la PKC, y ello provoca un aumento de la tasa de endocitosis. El inhibidor de la PKA no provocó ninguna variación en la tasa de endocitosis indicando que el receptor no es sustrato para esta quinasa como fue descrito anteriormente por Widmann en 1997. Nuestros datos sugieren que, cuando el receptor de GLP-1 no es fosforilado por PKC es mejor sustrato para las GRKs o bien que la PKC regula la actividad de la GRK. Se ha visto que existe una relación entre la PKC y las GRKs de manera que en algunos sistemas la PKC puede inhibir o estimular a las GRKs implicadas en la fosforilación del receptor activado por el agonista. Así la PKC es capaz de fosforilar GRK2 y esto aumenta la actividad de esta quinasa (Chuang, y cols., 1995); el efecto opuesto se ha descrito para GRK5 que es también sustrato para la PKC pero en este caso la fosforilación inhibe la actividad de esta quinasa (Pronin, y cols., 1997). En el caso del receptor de GLP-1 no se sabe cual de las GRKs cataliza su fosforilación. Nuestros resultados sugieren que la PKC puede inhibir la GRK que fosforila el receptor. Con el receptor β -adrenérgico se ha descrito el efecto opuesto, ya que este receptor es fosforilado por la GRK2 cuya actividad es a su vez estimulada por la PKC (Winstel, y cols., 1996).

En el caso de los mutantes GLPR A⁴³⁸, y GLPR A^{431/432} el tratamiento con el inhibidor de la PKC provocó un aumento de la tasa de endocitosis muy similar al obtenido en el caso del receptor control. En las células que expresan receptores GLPR 435R el inhibidor de la PKC no modificó significativamente la tasa de endocitosis. Estos receptores no poseen los sitios de fosforilación de GRKs. Por el contrario el inhibidor de la PKC en el caso del GLPR 418R produjo una ligera disminución de la tasa de endocitosis, aunque no fue significativa y en el receptor GLPR 419 Δ 435 A⁴³⁸ se produjo una disminución de la tasa de endocitosis. La ausencia de efecto del inhibidor de la PKC en los residuos 419-435 y el aumento de la tasa de endocitosis promovida por esta delección sugiere que en estos receptores la PKC no interacciona con el receptor, lo que evitaría la fosforilación de GRKs y originaría un aumento de la tasa de endocitosis tras la unión del agonista.

CONCLUSIONES

Con el fin de obtener una mayor información sobre el mecanismo de señalización del receptor de GLP-1, hemos realizado una serie de estudios mediante mutaciones puntuales en el extremo carboxilo terminal del receptor de GLP-1, de los que se han obtenido las siguientes conclusiones en cuanto a los procesos de unión de ligando, endocitosis y génesis de segundos mensajeros:

- 1.- Los receptores de GLP-1 transfectados a la línea celular CHO muestran un comportamiento similar al que se ha descrito anteriormente para dicho receptor en células β pancreáticas para los procesos de endocitosis y transducción de señales generadas desde el receptor.
- 2.- Las mutaciones realizadas en el extremo carboxilo terminal del receptor de GLP-1 no alteraron la afinidad del ligando por los receptores modificados.
- 3.- La transducción de señales generadas desde el receptor de GLP-1 a través del sistema de la adenilato ciclasa está regulada por el extremo carboxilo terminal, aunque la región que interacciona con la proteína G es el tercer lazo intracelular. Determinadas regiones de este dominio influyen de manera positiva o negativa en la producción de AMPc.
- 4.- La estimulación del receptor de GLP-1 por su agonista también incrementó la fosforilación de ERK1/ERK2, miembros de la ruta de las MAPKs. En este proceso el dominio carboxilo terminal del receptor fue responsable de la velocidad de activación de esa vía de señalización.
- 5.- La tasa de endocitosis del receptor de GLP-1, está regulada de manera positiva o negativa por diferentes regiones de su extremo carboxilo terminal. La fosforilación de los residuos de serina del extremo C-terminal no es la única señal que determina la internación del receptor.

6.- La estimulación de la síntesis de segundos mensajeros y la internación del receptor de GLP-1 son procesos independientes.

7.- El proceso endocítico de los complejos ligando-receptor de GLP-1 es mediado por vesículas recubiertas de clatrina. La delección de los residuos 420-463 del receptor promueve la endocitosis por vesículas no recubiertas de clatrina y un reciclamiento más rápido de estos receptores.

8.- La sustitución de la cisteína en posición 438 por alanina de la secuencia del receptor de GLP-1, sitio de posible acilación, no alteró el mecanismo de endocitosis del receptor, pero si la transducción de la señal, disminuyendo la producción de AMPc y retrasando la fosforilación de ERK1/ERK2.

9.- Los fenómenos de desensibilización homóloga requieren la presencia de los residuos 437-463 en el receptor de GLP-1, y son independientes de la modificación por acilación.

10.- La región del receptor de GLP-1 situada entre los aminoácidos 419-435, es necesaria para la fosforilación por la PKC en un sistema "*in vitro*".

11.- La inhibición de la proteína quinasa dependiente de calcio (PKC) estimuló la endocitosis del receptor de GLP-1, siendo necesarios para ello los residuos 419-435 del dominio carboxilo terminal del receptor.

BIBLIOGRAFIA

- Abel, K. y Jurnak, F. (1996).** A complex profile of protein elongation: translating chemical energy into molecular movement. *Structure* 4: 229-238.
- Alcantara, AI., Morales, M., Delgado, E., Lopez-Delgado, MI., Clemente, F., Luque, MA., Malasie, WJ. y Valverde, I. (1997).** Exendin-4 agonist and exendin (9-39)amide antagonist of the GLP-1 (7-36) amide effects in liver and muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 341: 1-7.
- Alvarez, E., Girones, N. y Davis, RJ. (1990).** Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid. *J. Biol. Chem.* 265: 16644-55.
- Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, JA., Thorens, B. y Blázquez, E. (1996).** Expresión of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J. Neurochem.* 66: 920-927.
- Barlic, J., Andrews, JD., Kelvin, AA., Bosinger, SE., Dobransky, T., Feldman, RD., Fergusson, SSG y Kelvin, DJ. (2000).** Regulation by Cxcr1 of tyrosine kinase activation and granule release through β -arrestin. *Nat. Immunol.* 1: 227:233.
- Barragán, JM., Eng, J., Rodriguez, R. y Blázquez, E. (1999).** Neural contribution to the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide on arterial blood pressure and heart rate in rats. *Am. J. Physiol.* 277: E784-E791.
- Barragán, JM., Rodriguez, RE., Eng, J. y Blázquez, E., (1996).** Interactions of exendin-(9-39) with the effects of glucagon-like peptide-1-(7-36)amide and exendin-4 on arterial blood pressure and heart rate in rats. *Regulatory Peptides* 67: 63-68.
- Barragán, JM., Rodriguez, R. y Blázquez, E. (1994).** Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36)amide in rats. *Am. J. Physiol.* 266: E49-E466.
- Bell, GI., Santerre, RF. y Mullenbanch GT. (1983).** Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302: 716-718.
- Benito, E., Blazquez, E., y Bosch, MA. (1998).** Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide increases pulmonary surfactant secretion through a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase mechanism in rat type II pneumocytes. *Endocrinology* 139: 2363-2368.
- Benya, RV., Fathi, Z., Battery, JF. y Jensen, RT. (1993).** Serines and threonines in the gastrin-releasing peptide receptor carboxyl terminus mediate internalization. *J. Biol. Chem.* 268: 20285-90.

- Blázquez, E., Alvarez, E., Navarro, M., Roncero, I., Rodríguez-Fonseca, F., Chowen, JA. y Zuco, JA. (1998).** Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide as a novel neuropeptide. *Mol. Neurobiol.* 18: 157-173.
- Bohm, SK., Khitin, LM., Smeekens, SP., Grady, EF., Payan, DG. y Bunnett, NW. (1997).** Identification of potential tyrosine-containing endocytic motifs in the carboxyl-tail and seventh transmembrane domain of the neurokinin 1 receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 2363-72.
- Bonatti, S., Migliaccio, G. y Simons, K. (1989).** Palmitoylation of viral membrane glycoproteins takes place after exit from the endoplasmic reticulum *J. Biol. Chem.* 264: 12590-12595.
- Bourne, HR. (1995).** Signal transduction. Team blue sees red. *Nature* 376: 727-729.
- Bouvier, M., Hausdorff, WP., De Blasi, A., O'Dowd, BF., Kobika, BK., Caron, MG. y Lefkowitz, RJ. (1988).** Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature.* 333: 370-3.
- Bouvier, M., Loisel, TP. y Hebert, T. (1995).** Dynamic regulation of G-protein coupled receptor palmitoylation: potential role in receptor function. *Biochem. Soc. T.* 23: 577-581.
- Bullock, BP., Scott Heller, R. y Habener, JF. (1996).** Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 137: 2968-2978.
- Calvo, JC., Yusta, B., Mora, F. y Blázquez, E. (1995)** Structural characterization by affinity cross-linking of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptor in rat brain. *J. Neurochem.* 64: 299-306.
- Campbell, PT., Hnatowich, M., O'Dowd, BF., Caron, MG., Lefkowitz, RJ. y Hausdorff, WP. (1991).** Mutations of the human beta 2-adrenergic receptor that impair coupling to Gs interfere with receptor down-regulation but not sequestration. *Mol. Pharmacol.* 39: 192-8.
- Campos, RV., Lee, YC. y Drucker, DJ. (1994).** Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 134: 2156-64.
- Casey, PJ. (1995).** Protein lipidation in cell signaling. *Science* 268: 221-225. (Review).
- Chang, MP., Mallet, WG., Mostov, KE. y Brodsky, FM. (1993).** Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of alpha-adaptin subunit to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits. *EMBO J.* 12: 2169-2180.

- Chen, CY., Dion, SB., Kim, CM. y Benovic, JL. (1993).** β -adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J. Biol. Chem.* 268: 7825-7831.
- Chen, RS., Sarnecki, C. y Blenis, J. (1992).** Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 12: 915-927.
- Cheung, YD., Feltham, I., Thompson, P. y Triggle, CR. (1990).** Alpha-adrenoceptor activation of polyphosphoinositide hydrolysis in the rat tail artery. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2425-32.
- Chuang, TT., LeVine, H 3rd. y De Blasi, A. (1995).** Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270: 18660-18665.
- Cobb, MH. y Goldsmith, EJ. (1995)** How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270: 14843-14846.
- Courtoy, PJ. (1993).** Analytical subcellular fractionation of endosomal compartments in rat hepatocytes. *Subcell Biochem.* 19: 29-68. (Review).
- Daaka, Y., Luttrell, LM., Ahn, S., Della Rocca, GJ., Ferguson, SSG., Caron, MG. y Lefkowitz, R.J. (1998).** Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 685-688.
- Davis, R.J. (1995).** Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Reprod Dev.* 42: 459-467.
- DeFea, K. y Roth, RA. (1997).** Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein-kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 31400-31406.
- Delgado, E., Luque, MA., Alcántara, A., Trapote, MA., Clemente, F., Galera, C., Valverde, I. y Villanueva-Peñacarrillo, ML. (1995).** Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides* 16: 225-229.
- Deng, WP. y Nickoloff, JA. (1992).** Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200: 81.
- Dhanasekaran, N., Tsim, ST., Dermott, JM. y Osesime, D. (1998).** Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* 17: 1383-1394.
- Dillon, JS., Tanizawa, Y., Wheeler, MB., Leng, XH., Ligon, BB. y Rabin, DH. (1993).** Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology* 133: 1907-1910.
- Dohlman, HG. y Thorner, J. (1997).** RGS proteins and signalling by heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 272: 3871-3874.

- Drucker, D. y Asa, S. (1988).** Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J. Biol. Chem.* 263: 13475-13478.
- Drucker, DJ. (1998).** Glucagon-like peptides. *Diabetes.* 47(2): 159-69.
- Dunphy, JT., y Linder, ME. (1998).** Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1436: 245-261. (Review).
- Eason, MG., Jacinto, MT., Theiss, CT. y Liggett, SB. (1994).** The palmitoylated cysteine of the cytoplasmic tail of α 2A-adrenergic receptors confers subtype-specific agonist-promoted downregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11178-11182.
- Eng, J., Kleiman, WA., Singh, G. y Raufman, JP. (1992).** Isolation and characterization of exendin-4, and exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 267: 7402-7405.
- Eugeni, G., Ponimaskin, Schmidt, MFG., Heine, M., Bickmeyer, U. y Richter, DW. (2001).** 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor expressed in Sf9 cells is palmitoylated in an agonist-dependent manner. *Biochem. J.* 353: 627-634.
- Farndale, RW., Wong, SK. y Martin, BR. (1987).** Activation of adenylate cyclase in human platelet membranes by guanosine 5'-[beta gamma-imido]triphosphate is inhibited by cyclic-AMP-dependent phosphorylation. Slow activation occurs in the absence of ATP. *Biochem. J.* 242: 637-43.
- Fehmann, HC., Göke, R. y Göke, B. (1995).** Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrine Reviews* 16: 390-410.
- Fergusson, SS., Downey, WE., Colapietro, AM., Borak, LS., Menard, L. y Caron, MG. (1996).** Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271: 363-6.
- Fraser, ID., Tavalin, SJ., Lester, LB, Langeberg, LK., Westphal, AM., Dean, RA., Marrion, NV. y Scott, JD. (1998).** A novel lipid-anchored A-kinase anchoring protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J.* 17: 2261-2272.
- Frodin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, CB. y Van Obberghen, E. (1995).** Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J. Biol. Chem.* 270: 7882-7889.

- García-Higuera, Y., Penela, P., Murga, C., Egea, G., Bonay, P., Benovic, JL. y Mayor, JJ. (1994).** Association of β -adrenergic receptor kinase with rat liver microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 1348-1355.
- Gaudin, P., Couvineau, A., Maoret, JJ., Rouyer-Fessard, C. y Laburthe, M. (1995).** Mutational analysis of cysteine residues within the extracellular domains of the human vasoactive intestinal peptide (VIP) 1 receptor identifies seven mutants that are defective in VIP binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 901-908.
- Go, WY., Holicky, EL., Hadac, EM., Rao, RV., Miller, LJ. (1998).** Identification of a domain in the carboxy terminus of CCK receptor that affects its intracellular trafficking. *Am. J. Physiol.* 275: G56-62.
- Göke, R. y Conlon, J.M. (1988).** Receptors for glucagon-like peptide-1 (7-36)amide on rat insulinoma-derived cells. *J. Endocrinol.* 116: 357-362.
- Göke, R., Fehmann, HC., Linn, T., Schmidt, H., Krause, J., Eng, J. y Göke, B. (1993).** Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin (9-39)-amide an antagonist at the glucagons-like peptide 1(7-36)amide receptor of insulin-secreting β -cells. *J. Biol. Chem.* 268: 19650-19655.
- Göke, R., Larsen, PJ., Mikkelsen, JD. y Sheikh, SP. (1995).** Identification of specific binding sites for glucagon-like peptide-1 on the posterior lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology.* 62: 130-4.
- González, N., Martín-Duce, A., Lozano, O., Trigo, MV., Sancho, V., Villanueva-Peñacarrillo, ML. y Valverde, I. (2002).** Efecto del GLP-1 sobre el transporte glucosa en miocitos de sujetos normales diabéticos. *Avances en Diabetología* vol. 18 supl. 1: 44-45.
- Hagler, HT., Willingham, MC. y Pastan, I. (1980).** Inhibitors of 125 I-epidermal growth factor internalization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 630-7.
- Hällbrink, M., Holmqvist, T., Olsson, M., Östenso, CG., Efendic, S. y Langel, Ü. (2001).** Different domains in the third intracellular loop of the GLP-1 receptor are responsible for Gas and Gai/G α 0 activation. *Biochem. Biophysica Acta* 1546: 79-86.
- Hausdorff, WP., Campell, PT., Ostrowski, J., Yu, SS., Caron, MG. y Lefkowitz, RJ. (1991).** A small region of the beta-adrenergic receptor is selectively involved in its rapid regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2979-83.
- Hawtin, SR., Tobin, AB., Patel, S. y Wheatley, M. (2001).** Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signalling agonist-induced receptor phosphorylation and sequestration. *J. Biol. Chem.* 276: 38139-38146.

- Hayashi, MK. y Haga, T. (1997).** Palmitoylation of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: reduction in their ability to activate G proteins by mutation of a putative palmitoylation site, cysteine 457, in the carboxyl-terminal tail. *Arch. Biochem. Biophys.* 340: 376-82.
- Heller, RS. y Aponte, GW. (1995).** Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide. *Am. J. Physiol.* 269: G852-60.
- Henser, JE. y Anderson, RG. (1989).** Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell. Biol.* 108: 389-400.
- Holst, JJ. (1994).** Glucagon-like peptide-1(GLP-1) a newly discovered GI hormone. *Gastroenterology* 107: 1848-1855.
- Holz, GG., Leech, CA. y Habener, JF. (1995).** Activation of a camp-regulated Ca²⁺-signalling pathway in pancreatic beta-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J. Biol. Chem.* 270: 17749-17757.
- Huang, Z., Chen, Y. y Nissenson, RA. (1995a).** The cytoplasmic tail of the G-protein-coupled receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein contains positive and negative signals for endocytosis. *J. Biol. Chem.* 270: 151-6.
- Huang, Z., Chen, Y., Pratt, S., Chen, TH., Bambino, T., Shoback, DH. y Nissenson, RA. (1995b).** Mutational analysis of the cytoplasmic tail of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein: effects on receptor expression and signaling. *Mol. Endocrinol.* 9:1240-9.
- Hui, H., Wright, C. y Perfetti, R. (2001).** Glucagon-like peptide-1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes.* 50: 785-96.
- Hunter, WH. y Greenwood. (1962).** Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature.* 194: 495-496.
- Hunyady, L., Bankal, AJ., Balla, T. y Catt, KJ. (1994).** Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 269: 24798-804.
- Jensen, AA., Pedersen, UB., Kiemer, A., Din, N. y Andersen, PH. (1995).** Functional importance of the carboxyl tail cysteine residues in the human D1 dopamine receptor. *J Neurochem.* 65: 1325-31.
- Jin, H., Xie, Z., George, SR. y O'Dowd, BF. (1999).** Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D(1) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 386: 305-12.

- Kawate, N. y Menon, KM. (1994).** Palmitoylation of luteinizing hormone/human choriogonadotropin receptors in transfected cells. Abolition of palmitoylation by mutation of Cys-621 and Cys-622 residues in the cytoplasmic tail increases ligand-induced internalization of the receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 30651-30658.
- Kennedy, ME. y Limbird, LE. (1994).** Palmitoylation of the alpha 2A-adrenergic receptor. Analysis of the sequence requirements for and the dynamic properties of alpha 2A-adrenergic receptor palmitoylation. *J. Biol. Chem.* 269: 31915-22.
- Khokhlatchev, AV., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. y Cobb, MH. (1998).** Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93: 605-615.
- Kieffer, Tj. Heller, RS., Unson, CG., Weir, GC. y Habener, JF. (1996).** Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology* 137: 5119-5125.
- Kunapuli, P., Gurevich, VV. y Benovic, JL. (1994).** Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G-protein-coupled receptor kinase GRK5. *J. Biol. Chem.* 269: 10209-10212.
- Laburthe, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, JJ., Rouyer-Fessard, C. y Nicole P. (1996).** Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1 and the others members of their family of G-protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann. NY Acad. Sci.* 80: 94-111.
- Laemli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 221: 680-685.
- Lamaze, C. y Schmid, SL. (1995).** The emerge of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 573-80.
- Lamb, JE., Ray, F., Ward, JH., Kushner, JP. y Kaplan, J. (1983).** Internalization and subcellular localization of transferrin and transferrin receptors in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 258: 8751-8.
- Lambert, PD., Wilding, JP., Turton, MD., Ghatei, MA. y Bloom, SR. (1994).** Effect of food deprivation and streptozotocin-induced diabetes on hypothalamic neuropeptide Y release as measured by a radioimmunoassay-linked microdialysis procedure. *Brain. Res.* 656: 135-40.
- Laporte, SA., Oakley, RH., Zhang, J., Holt, JA., Ferguson, SS., Caron, MG. y Barak, LS. (1999).** The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 3712-7.

- Lin, FT., Miller, WE., Luttrell, LM. y Lefkowitz, RJ. (1999).** Feedback regulation of beta-arrestin 1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* 274: 15971-15974.
- Loisel, TP., Adam, L., Hebert, TE. y Bouvier, M. (1996).** Agonist stimulation increases the turnover rate of β 2-AR-bound palmitate and promotes receptor depalmitoylation. *Biochemistry* 10: 15923-15932.
- Lopata, MA., Cleveland, DW., y Sollner-Webb, B. (1984).** High-level expression of a chloramphenicol acetyltransferase gene by DEAE-dextran-mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucl. Acids. Res.* 12: 5707.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. y Randall, LJ. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-273.
- Magee, AI., Gutierrez, L., Mckay, IA, Marshall, CJ. y Hall, A. (1987).** Dynamic fatty acylation of p21N-ras. *EMBO J.* 6: 3353-7.
- Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, MF. y Marshall, CJ. (1998).** Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 280: 109-112.
- Marie, J., Boissard, C., Skoglund, G., Rosselin, G. y Breant, B. (1996).** Glucagon acts through its own receptors in the presence of functional glucagon-like peptide-1 receptors on hamster insulinoma. *Endocrinology* 137: 4108-4114.
- Mathi, SK., Chan, Y., Li, X. y Wheeler, MB. (1997).** Scanning of the glucagon-like peptide-1 receptors localizes G protein-activating determinants primarily to the N terminus of the third intracellular loop. *Mol. Endocrinology* 11: 424-432.
- Mayor, S., Presley, JF. y Maxfield, FR. (1993).** Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell. Biol.* 121: 1257-69.
- Mentlein, R., Gallwitz, B., Schmidt, WE., (1993).** Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214: 829-835.
- Mérida, E., Delgado, E., Molina, LM., Villanueva-Peñacarrillo, ML. y Valverde, I. (1993).** Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 1654-7.
- Mochly-Rosen, D. (1995).** Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science.* 268: 247-51. Review.

- Moens, K., Flamez, D., Van Schravendijk, C., Ling, Z., Pipeleers, D. y Schuit, F. (1998).** Dual glucagon recognition by pancreatic β -cells via glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors. *Diabetes* 47: 66-72.
- Moffet, S., Mouillac, B., Bonin, H. y Bouvier, M. (1993).** Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human β 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys 341. *EMBO J.* 12: 349-356.
- Moffett, S., Adam, L., Bonin, H., Loisel, TP., Bouvier, M. y Mouillac, B. (1996).** Palmitoylated cysteine 341 modulates phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 21490-7.
- Montrose-Rafizadeh, C., Avdonin, P., Garant, MJ., Rodgers, BD., Kole, S., Yang, H., Levine, MA., Schwindinger, W. y Bernier, M. (1999).** Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 140: 1132-1140.
- Mora, F., Exposito, I., Sanz, B. y Blázquez, E. (1992).** Selective release of glutamine and glutamic acid produced by perfusion of GLP-1 (7-36) amide in the basal ganglia of conscious rat. *Brain. Res. Bull.* 29: 359-361.
- Morello, JP. y Bouvier, M. (1996).** Palmitoylation: a post-translational modification that regulates signalling from G-protein coupled receptors. *Biochem. Cell. Biol.* 74: 449-457.
- Nakata, H., Kameyama, K., Haga, K. y Haga, T. (1994).** Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype). *Eur. J. Biochem.* 220: 29-36.
- Navarro, M., Rodriguez de Fonseca, F., Alvarez, E., Chowen, JA., Zueco, JA., Gomez, R., Eng, J. y Blázquez, E. (1996).** Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonist as an inhibitory signal for food and water intake. *J. Neurochem.* 67: 1982-1991.
- Nussenzveig, D. R., Hinflink, M. y Gershengorn, MC. (1993).** Agonist-stimulated internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor is dependent on two domains in the receptor carboxyl terminus..*J. Biol. Chem.* 268: 2389-2392.
- O'Dowd, BF., Hnatowitch, M., Caron, MG., Lefkowitz, RJ. y Bouvier, M. (1989).** Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 7564-9.

- O'Shea, D., Jun, I., Chen, X., Bloom, S. y Herbert, J. (1996).** A role for central glucagon-like peptide-1 in temperature regulation. *Neuroreport* 7: 830-832.
- Oakley, RH., Laporte, SA., Holt, JA., Barak, LS. y Caron, MG. (1999).** Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 274: 32248-57.
- Okamoto, Y., Nimomiya, H., Tanioka, M., Sakamoto, A., Miwa, S. y Masaki, T. (1997).** Palmitoylation of human endothelin B. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J. Biol. Chem.* 272: 21589-96.
- Onorato, JJ., Palczewski, K., Regan, JW., Caron, MG., Lefkowitz, RJ. y Benovic, JL. (1991).** Role of acidic amino acids in peptide substrates of the β -adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase. *Biochemistry* 30: 5118-5125.
- Orskov, C., Poulsen, SS., Moller, M. y Holst, JJ. (1996).** Glucagon-like peptide I receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide I. *Diabetes.* 45: 832-5.
- Ovchinnikov, YuA., Abdulaev, NG. y Bogachuk, AS. (1988).** Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated. *FEBS Lett.* 230: 1-5.
- Palmer, TM y Stiles GL. (2000).** Identification of threonine residues controlling the agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A(3) adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* 57: 539-545.
- Parton, RG. y Simons, K. (1995).** Digging into caveolae. *Science* 269: 1398-1399.
- Pawson, T. y Scott, JD. (1997).** Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science.* 278: 2075-80. Review.
- Peeler, JS., Donzell, WC. y Anderson, RG. (1993).** The appendage domain of the AP-2 subunit is not required for assembly or invagination of clathrin-coated pits. *J. Cell. Biol.* 120: 47-54.
- Perfetti, R. y Merkel, P. (2000).** Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic β -cell function. *Eur. J. Endocrinol.* 143: 717-725.
- Pickering, DS., Taverna, FA., Salter, MW. y Hampson, DR. (1995).** Palmitoylation of the GluR6 kainate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 12090-4.
- Pitcher, JA., Freedman, NJ. y Lefkowitz, RJ. (1998).** G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 653-92. Review.

- Pitcher, JA., Touhara, K., Payne, ES. y Lefkowitz, RJ. (1995).** Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* 270: 11707-10.
- Pizard, A., Blautkat, A., Michineau, S., Dikic, I., Muller-Esterl, W., Alhec-Gelas, F. y Rajerison, RM. (2001).** Palmitoylation of the human bradykinin B2 receptor influences ligand efficacy. *Biochemistry.* 40: 15743-51.
- Ponimaskin, EG., Schmidt, MF., Heine, M., Bickmeyer, U. y Richter, DW. (2001).** 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor expressed in Sf9 cells is palmitoylated in an agonist-dependent manner. *Biochem. J.* 353: 627-34.
- Pouyssegur, J. y Böhm, SK. (1992).** Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu. Re. Physiol.* 54: 195-210.
- Pronin, AN. y Benovic, JL. (1997).** Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272: 3806-12.
- Radhika, V. y Dahanasekaran, N. (2001).** Transforming G proteins. *Oncogene.* 20: 1607-14. Review.
- Rana, BK., Shiina, T. y Insel, PA. (2001).** Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 93-624.
- Redondo, A., Gonzalez, N., Trigo, MV., Sancho, V. y Villanueva-Peñacarrillo, ML. (2002)** El GLP-1 induce la activación de PI-K en adipocitos de rata. *Avances en Diabetología* vol. 18 supl. 1: 44.
- Richter, G., Feddersen, O., Wagner, U., Barth, P., Göke, G. y Göke, B. (1993).** GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *Am. J. Physiol.* 265: L374-L381.
- Robinson, MJ., y Cobb, MH., (1997)** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr.Opinn. Cell. Biol.* 9: 180-186.
- Robinson, MS. (1994).** The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opinn. Cell. Biol.* 6: 538-544. Review.
- Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, JA., Maestre, O., Gomez, R., Muñoz, RM., Eng, J. y Blazquez, E. (2000).** Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism.* 49: 709-17.

- Roettger, BF., Rentsch, RV., Pinon, D., Holicky, E., Hadac, E., Larkin, JM. y Miller, LJ. (1995).** Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell. Biol.* 128: 1029-41.
- Ruiz-Grande, C., Alarcón, C., Mérida, E. y Valverde, I. (1992).** Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 13: 13-16.
- Ruiz-Grande, C., Pintado, J., Alarcón, C., Castilla, C. y Valverde, I. (1990).** Renal catabolism of human glucagon-like peptides 1 y 2. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 168-1573.
- Sadeghi, HM., Innamorati, G., Dagarag, M. y Birnbaumer, M. (1997).** Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor. *Mol. Pharmacol.* 52: 21-9.
- Salomon, Y. (1991).** Cellular responsiveness to hormones and neurotransmitters: conversion of [3H]cAMP in cell monolayers, cell suspensions, and tissue slices. *Methods Enzymol.* 195: 22-8.
- Sandvig, K. y van Deurs, B. (1991).** Endocytosis without clathrin (a minireview). *Cell. Biol. Int. Rep.* 15: 3-8.
- Schjoldager, BT., Mortensen, PE., Christiansen, J., Orskov, C. y Holst, JJ. (1989).** GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Dig. Dis. Sci.* 34: 703-8.
- Schleicher, S., Boekhoff, I., Arriza, J., Lefkowitz, R.J. y Breer, H. (1993).** A beta-adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1420-4.
- Schmidler, J., Dehne, K., Allescher, HD., Schusdziarra, V., Classen, M., Holst, JJ., Polack, A. y Schepp, W. (1994).** Rat parietal cell receptors for GLP-1-(7-36) amide: northern blot, cross-linking, and radioligand binding. *Am. J. Physiol.* 267: G423-32.
- Schülein, R., Liebenhoff, U., Muller, H., Birnbaumer, M. y Rosenthal, W. (1996).** Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *Biochem. J.* 313: 611-6.
- Sege, RD., Kozarsky, K., Nelson, DL. y Krieger, M. (1984).** Expression and regulation of human low-density lipoprotein receptors in Chinese hamster ovary cells. *Nature.* 307: 742-5.
- Stoffel, RH., Inglese, J., Macrae, AD., Lefkowitz, R.J. y Premont, RT. (1998).** Palmitoylation increases the kinase activity of the G protein-coupled receptor kinase, GRK6. *Biochemistry* 37: 16053-16059.

- Strader, CD., Dixon, RA., Cheung, AH., Candelore, MR., Blake, AD, y Sigal, IS. (1987).** Mutations that uncouple the beta-adrenergic receptor from Gs and increase agonist affinity. *J. Biol. Chem.* 262: 16439-43.
- Strader, CD., Sigal, IS. y Dixon, RAF. (1989).** Structural basis of β -adrenergic receptor function. *Faseb J.* 3: 1825-1832.
- Takhar, S., Gyomory, S., Su, R., Mathi, S., Li, X. y Wheeler, M.B. (1996).** The third cytoplasmic domain of the GLP-1(7-36)amide receptor is required for coupling to the adenylyl cyclase system. *Endocrinology.* 137: 2175-2178.
- Tanaka, K., Nagayama, Y., Nishihara, E., Namba, H., Yamashita, S. y Niwa, M. (1998).** Palmitoylation of human thyrotropin receptor: Slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant. *Endocrinology* 139: 803-806.
- Thorens, B. (1992).** Expression cloning of the pancreatic beta-cell receptor for the glucocretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8641-8645.
- Thorens, B., Porret, A., Bühler, L., Deng, SP. Morel, P. y Widmann, C. (1993).** Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor: demonstration that exendin-4 is an antagonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42: 1678-1682.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979).** Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Traub, LM., Kornfeld, S. y Ungewickell, E. (1995).** Different domains of the AP-1 adaptor complex are required for Golgi membrane binding and clathrin recruitment. *J. Biol. Chem.* 270: 4933-42.
- Trowbridge, IS., Collawn, JF. y Hopkins, CR. (1993).** Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 129-61. Review.
- Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H. y Nagao, T. (1994).** Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G-protein coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. *J. Biol. Chem.* 269: 32522-32527.
- Turton, MD., O`Shea, D., Gunn, I., Beak, SA., Edwards, CM., Meeran, K., Choi, SJ., Taylor, GM., Heath, MM., Lambert, PD., Wilding, JP., Smith, DM., Ghatei, MA., Herbert, J. y Bloom, SR. (1996).** A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature.* 379: 69-72.

- Uttenthal, LO. y Blázquez, E. (1990).** Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands. *FEBS Lett.* 262: 139-141.
- Uttenthal, LO., Toledano, A. y Blázquez, E. (1992).** Autoradiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide in rat brain. *Neuropeptides* 21: 143-146.
- Valverde, I., Mérida, E., Delgado, E., Trapote, MA. y Villanueva-Peñacarrillo, ML. (1993).** Presence and characterization of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology* 132: 75-79.
- Valverde, I., Morales, M., Clemente, F., Lopez-Delgado, MI., Delgado, E., Perea, A y Villanueva-Peñacarrillo, ML. (1994).** Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Lett.* 349: 313-316.
- Vara, E., Arias-Díaz, J., García, C., Balibrea, JL. y Blázquez, E. (2001).** Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide stimulates surfactant secretion in human type II Pneumocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: 840-846.
- Verheijen, MJ. y Defize, LH. (1997).** Parathyroid hormone activates mitogen-activated protein kinase via a cAMP-mediated pathway independent of Ras. *J. Biol. Chem.* 272: 3423-9.
- Villanueva-Peñacarrillo, ML., Alcántara, AI., Clemente, F., Delgado, E. y Valverde, I. (1994).** Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in rat skeletal muscle. *Diabetología* 37: 1163-1166.
- Villanueva-Peñacarrillo, ML., Delgado, E., Trapote, MA., Alcántara, A., Clemente, F., Luque, MA., Perea, A. y Valverde, I. (1995).** Glucagon-like peptide 1 binding to rat hepatic membranes. *J. Endocrinol.* 146: 183-189.
- Vogler, O., Nolte, B., Voss, M., Schmidt, M., Jakobs, KH. y van Koppe, CJ. (1999).** Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by β -arrestin. *J. Biol. Chem.* 274: 12333-12338.
- Wei, Y. y Mojsov, S. (1995).** Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-1: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett.* 358: 219-224.
- Wettergren, A., Schjoldager, B., Mortensen, PE., Myhre, J., Christiansen, J. y Holst, JJ. (1993).** Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig. Dis. Sci.* 38: 665-73.
- Whaley, BS., Yuan, N., Birnbaumer, L., Clark, RB. y Barber, R. (1994).** Differential expression of the beta-adrenergic receptor modifies agonist stimulation of adenylyl cyclase: a quantitative evaluation. *Mol. Pharmacol.* 45: 481-9.

- Wheeler, MD., Lu, M., Dillon, JS., Leng, X-H., Chen, C. y Boyd, AE. (1993).** Functional expression of the rat glucagon-like peptide-1 receptor: evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase C. *Endocrinology* 133: 57-62.
- Whistler, JL. y von Zastrow, M. (1999).** Dissociation of functional roles of dynamin in receptor-mediated endocytosis and mitogenic signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274: 24575-24578.
- Widmann, C., Dolci, W. y Thorens, B. (1995).** Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas. *Biochem. J.* 310: 203-14.
- Widmann, C., Dolci, W. y Thorens, B. (1996a).** Heterologous desensitization of the glucagon-like peptide-1 receptor by phorbol esters requires phosphorylation of the cytoplasmic tail at four different sites. *J. Biol. Chem.* 271: 19957-63.
- Widmann, C., Dolci, W. y Thorens, B. (1996b).** Desensitization and phosphorylation of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor by GLP-1 and 4-phorbol 12-myristate 13-acetate. *Mol. Endocrinol.* 10: 62-75.
- Widmann, C., Dolci, W. y Thorens, B. (1997).** Internalization and homologous desensitization of the GLP-1 receptor depend on phosphorylation of the receptor carboxyl tail at the same three sites. *Mol. Endocrinol.* 11: 1094-102.
- Wiley, HS. y Cunningham, DD. (1982).** The endocytotic rate constant. A cellular parameter for quantitating receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 257: 4222-9.
- Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E. y Lohse, MJ. (1996).** Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 2105-9.
- Xiao, Q., Jeng, W. y Wheeler, MB. (2000).** Characterization of glucagon-like peptide-1 receptor-binding determinants. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 321-335.
- Yamauchi, J., Nagao, M., Kaziro, Y. y Itoh, H. (1997).** Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signalling through G protein-coupled receptors. Involvement of G $\beta\gamma$ and G $\alpha_q/11$ subunits. *J. Biol. Chem.* 272: 27771-27777.
- Yang, XJ., Kow, LM., Funabashi, T. y Mobbs, CV. (1999).** Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes.* 48: 1763-72.
- Zhu, H., Wang, H. y Ascoli, M. (1995).** The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. *Mol. Endocrinol.* 9: 141-50.