Mecanismos de regulación de receptores acoplados a proteínas G

Federico Mayor, Jr.

Departamento de Biología Molecular y Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.
Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) constituyen la más importante superfamilia de receptores de membrana plasmática, y median las acciones de numerosas hormonas, neurotransmisores, quimioquinas y estímulos sensoriales. La activación de este tipo de receptores conduce a la interacción con proteínas G heterotriméricas específicas, que se disocian en subunidades α y $\beta\gamma$, que a su vez modulan la actividad de diferentes efectores de membrana plasmática, como adenilil ciclasas, fosfolipasas, canales iónicos, etc. Más recientemente se ha puesto de manifiesto que los GPCR modulan también vías de cinasas mitogénicas, lo que refuerza el amplio espectro de acciones fisiológicas mediadas por este tipo de receptores, y el interés en conocer con detalle sus mecanismos de activación y desactivación[1-3]. En efecto, una característica general de estos receptores es que poseen complejos mecanismos de regulación que modulan su capacidad de respuesta, y que son esenciales en la integración de señales celulares y en procesos de plasticidad y desensibilización. Estos mecanismos de regulación pueden afectar a su expresión, a su funcionalidad y a su localización subcelular.

El trabajo realizado por diversos grupos en los últimos 12 años ha puesto de manifiesto la existencia de dos familias de proteínas que desempeñan un papel clave en la rápida modulación de la funcionalidad y la dinámica intracelular de receptores tras la activación por agonistas. En primer lugar, la familia de cinasas de GPCR, denominadas GRK (*G protein-coupled Receptor Kinases*), que fosforilan a estos receptores de forma dependiente de agonista[4-6]. En segundo lugar, las proteínas desacoplantes denominadas arrestinas, que se unen a los receptores que han sido fosforilados por GRK, impidiendo de esta forma la transducción de la señal desde aquél a las proteínas G heterotriméricas[6,7]. Posteriormente, se inicia un proceso de internalización transitoria de receptores que permite su desfosforilación y reciclaje funcional[5,8]. Este complejo entramado regulatorio es, por tanto, parte esencial del sistema de transducción de señales al interior celular.

El papel esencial de las GRK y arrestinas en la modulación de la función de GPCR sugiere que cambios en su expresión y/o actividad afectarán a la eficacia de los sistemas de transducción y podrán tener trascendencia fisiopatológica, lo que constituye la hipótesis fundamental del proyecto de investigación de nuestro laboratorio. El desarrollo de esta hipótesis requiere un incremento sustancial del conocimiento de los mecanismos moleculares de regulación de la funcionalidad y de la expresión de GRK y arrestinas, así como de sus papeles en diversos procesos fisiológicos, lo que permitirá también la identificación de nuevas dianas y estrategias terapéuticas.

Procesos de desensibilización de receptores acoplados a proteínas G

La desensibilización homóloga se define como la pérdida de respuesta de un receptor a sucesivas estimulaciones por su propio ligando. Utilizando inicialmente el modelo del adrenoceptor β_2 (β_2AR), se comprobó que la desensibilización promovida por sus agonistas implica muy principalmente a serina/treonina cinasas que fosforilan específicamente la forma activada del receptor. La primera de estas cinasas que se identificó se denominó βARK (β-*adrenergic receptor kinase*)[9]. La fosforilación mediada por βARK per se no desacopla al receptor de la proteína G, sino que más bien promueve la unión de un factor citosólico, la proteína β-arrestina, que forma parte de una familia de proteínas moduladoras[7]. La asociación

La investigación en el laboratorio del autor está financiada por el Ministerio de Educación y Cultura (DGICYT/PM95-0033) y la Unión Europea. El Centro de Biología Molecular recibe una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

de la β-arrestina es la responsable final del desacoplamiento, al impedir la interacción del receptor con la proteína G y bloquear así la transducción de la señal[4,5]. A este proceso de desacoplamiento sigue una rápida internalización transitoria del receptor en estructuras endocíticas, cuyo posible papel se ha sugerido que puede ser permitir la desfosforilación del receptor y su reciclado en estado funcional a la membrana plasmática (proceso de resensibilización), como se discutirá posteriormente.

A raíz de estos datos se empezó a comprobar que mecanismos de regulación muy similares operan en otros receptores acoplados a proteínas G. Además del sistema paralelo que rige en la retina (con la rodopsina, la rodopsina cinasa y la arrestina), se ha demostrado que βARK puede fosforilar y regular diversos receptores, como adrenoceptores α_2, muscarínicos, de sustancia P, de trombina, de angiotensina, receptores de aromas y otros muchos[4-6]. Estos datos, junto con la reciente caracterización de distintas cinasas relacionadas con βARK, que constituyen la denominada familia multigénica GRK, permite sugerir que todos los receptores acoplados a proteínas G tendrán mecanismos de regulación similares.

Familia de cinasas de receptores acoplados a proteínas G

Como ya se ha mencionado, βARK fue el primer miembro clonado de esta familia, y se denomina actualmente GRK2. Hasta el momento, se han identificado y clonado 6 GRK en mamíferos, y dos homólogos en *Drosophila* y en *C. elegans*[7-10]. La mayoría de las GRK, con la excepción de GRK1, que se expresa en retina y pineal y GRK4 (que se expresa mayoritariamente en testículo y células germinales), tienen un amplio patrón de expresión.

Las GRK comparten un dominio catalítico central de 272 aminoácidos homólogo a otras serina-treonina cinasas y difieren tanto en un extremo N-terminal de 183-188 residuos de funciones aún poco conocidas como en un dominio C-terminal de dimensión más variable y que contiene sitios de modificación postraduccional y regiones implicadas en la interacción con la membrana plasmática y con otras proteínas[10]. En efecto, puesto que sus sustratos conocidos, los GPCR, se encuentran en la membrana plasmática, otro aspecto importante a considerar es cómo las GRK se asocian o translocan a la membrana. La rodopsina cinasa (GRK1) posee en su extremo C-terminal el motivo CAAX que dirige su isoprenilación incorporando un grupo farnesilo. GRK2 y GRK3 poseen un dominio de interacción con las subunidades βγ de las proteínas G (residuos 546-670) que contiene un dominio de homología a pleckstrina (pH, residuos 553-651), presente en muchas proteínas de citosqueleto y proteínas señalizadoras[11]. Dado que las subunidades βγ están constitutivamente asociadas con las membranas a través del grupo geranilgeranilo de la subunidad γ, la unión de GRK2 con βγ sería el mecanismo seleccionado para el anclaje de estas cinasas. Esto permitiría un control muy exacto de localización de estas proteínas en un punto concreto de la membrana y en el momento en el que se necesitan, ya que la disponibilidad de subunidades βγ libres respondería a la activación de una población de receptores dada. Así mismo, la presencia de βγ estimula la actividad de GRK2[5,10].

El segmento de aminoácidos 643-673 de GRK2 parece ser crítico para la unión de Gβγ, y un péptido sintético correspondiente a esa secuencia bloquea la interacción entre ambas proteínas[12]. Por otra parte, se ha referido que el dominio N-terminal de la región de homología a pleckstrina interacciona con fosfatidilinositolbisfosfato (PIP2) y otros fosfolípidos. Datos muy recientes sugieren que la unión de lípidos y Gβγ al dominio C-terminal de GRK2 aumenta sinérgicamente la actividad de la cinasa y que ambos anclajes son precisos para una correcta localización de GRK2 en la membrana plasmática[13,14]. El conjunto de los datos parece sugerir que existen múltiples niveles de interacción que cooperan para la activación y translocación a la membrana de GRK2 tras la interacción del receptor con un agonista.

De hecho, la situación parece ser aún más compleja. Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que una fracción muy significativa de GRK2 está asociada a membranas internas microsomales en distintos tejidos y líneas celulares, lo que plantea nuevas preguntas sobre las funciones fisiológicas de esta cinasa[15,16]. Utilizando cinasa recombinante en sistemas reconstituidos, nuestro laboratorio ha encontrado que GRK2 se asocia con alta afinidad, como proteína periférica y mediante interacciones electrostáticas a una proteína integral de las membranas microsomales, de forma similar a su asociación transitoria con la membrana plasmática[17]. Es muy importante destacar que aunque las proteínas G endógenas de las membranas microsomales son capaces de estimular la actividad de GRK2 unida, las

subunidades βγ no parecen ser el principal componente de las membranas responsables de la unión de GRK2. A diferencia de lo que ocurre con las subunidades βγ, para las que GRK2 parece tener un sitio de unión en la zona C-terminal (véase anteriormente), nuestros datos indican que el extremo N-terminal de la cinasa sería el responsable de su interacción con membranas microsomales[17,18]. En definitiva, nuestros resultados sugieren la existencia de proteínas de anclaje adicionales para GRK2 y definen un nuevo dominio funcional en esta cinasa. En cuanto a otras GRK, GRK5 posee un dominio C-terminal rico en aminoácidos básicos y polares que promoverían su asociación a membranas a través de interacciones iónicas con grupos negativamente cargados de los fosfolípidos. Por último, GRK6 se modifica por palmitoilación en su región C-terminal, modulando así su asociación a membrana[10].

Además de los mecanismos descritos, la actividad y dinámica intracelular de las GRK, particularmente de la mejor conocida GRK2, podría estar modulada por su asociación con otras proteínas o mediante fosforilación por otras cinasas. Así, muy recientemente se ha descrito la fosforilación de GRK2 y GRK5 por PKC, lo que alteraría su actividad modulando su interacción con la membrana plasmática[4]. Datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la fosforilación de GRK2 por otro tipo de cinasas será también importante para su papel en la célula.

Por otra parte, datos recientes indican que GRK2 es capaz de asociarse a microtúbulos y de fosforilar tubulina[19], lo que aumenta el horizonte de sus funciones celulares. Por último, nuestro laboratorio ha identificado recientemente la existencia de un factor proteico citosólico capaz de modular la actividad de GRK2 (Ruiz-Gómez et al, en preparación). En resumen, la existencia de múltiples y complejos mecanismos de regulación de la actividad y la localización subcelular de GRK2 concuerda con un papel esencial de esta cinasa en la señalización mediada por GPCR.

Familia de proteínas desacoplantes de receptores acoplados a proteínas G: arrestinas y β-arrestinas

Las arrestinas desempeñan un papel clave en los procesos de desensibilización de GPCR, al interaccionar con el receptor fosforilado por GRK y desacoplar la señal de las proteínas G. La arrestina fue el primer miembro de la familia identificado y clonado. Es la proteína soluble más abundante en los segmentos externos de los fotorreceptores y su asociación a rodopsina fosforilada por la GRK1 bloquea completamente la señalización mediada por el receptor lumínico. Posteriormente se identificaron proteínas homólogas en sistemas distintos al visual, clonándose β-arrestina 1 y β-arrestina 2, de los que se conocen distintas variantes por *splicing* alternativo[7]. Los miembros de la familia de las arrestinas presentan una gran homología de secuencia, compartiendo un 45% de identidad en la región correspondiente a los residuos 16-349 de la arrestina. La mayor divergencia en la familia se concentra en el extremo C-terminal de las distintas variantes polipeptídicas, lo que probablemente determine su distinta sensibilidad a efectos reguladores, fosforilación u otras modificaciones postraduccionales[6].

Frente a los datos de que se dispone en el caso de GRK2 y otras GRK, se sabe muy poco acerca de los mecanismos implicados en modular la actividad o la localización subcelular de las arrestinas, lo que constituye un campo de gran atractivo para la investigación.

GRK2 y arrestinas e internalización de receptores acoplados a proteínas G

La presencia de agonistas induce, además del desacoplamiento funcional descrito entre receptores y proteínas G, un secuestro o internalización transitorio de receptores que en distintos casos se ha comprobado que tiene lugar en vesículas endosómicas cubiertas por clatrina. Sin embargo, no todos los GPCR tendrían que seguir esta vía endocítica[5,6,8].

El papel funcional del secuestro ha sido controvertido. Datos recientes indican que la internalización de receptores es una etapa necesaria en la desfosforilación y reciclado de GPCR previamente fosforilados por GRK y desacoplados por arrestinas. Krueger et al[20] han identificado una GPCR-fosfatasa, miembro de la familia de fosfatasas PP2A, que colocaliza con el βAR en endosomas durante la internalización promovida por agonista, y que puede actuar gracias a los cambios conformacionales que induce en el receptor el bajo pH intraluminal de las vesículas endocíticas, lo que explicaría el requerimiento de la internalización para la resensibilizacion. Así, el proceso de desensibilización en su conjunto resultaría del equilibrio entre los fenómenos de desacoplamiento y de reciclaje[5,8].

De hecho, datos muy recientes indicarían que tanto las arrestinas como GRK2 podrían

actuar como adaptadores moleculares entre el GPCR y proteínas implicadas en internalización. Un posible modelo para el proceso de internalización se basaría en la fosforilación del receptor por GRK2 en respuesta a agonista, lo que promovería el reclutamiento de β-arrestina, que a su vez actuaría como adaptador, acoplando el complejo a la maquinaria de la vía endosómica ya que es capaz de interaccionar in vitro con clatrina, un componente clave de las vesículas cubiertas[21,22]. Sin embargo, la situación puede ser más compleja, ya que, muy recientemente, nuestro grupo ha observado que GRK2, además, colocaliza con β_2AR internalizado[23]. Por tanto, es posible que GRK2 desempeñe también un papel de adaptador o de modulador del proceso de internalización.

La consecuencia funcional y fisiológica más importante que emerge de estas observaciones es que GRK y arrestinas desempeñan un papel central tanto en el proceso de desensibilización de GPCR como disparando y controlando su reciclaje y resensibilización. Así, la velocidad y el grado de desensibilización y secuestro de un determinado receptor dependerá del complemento celular y/o la actividad de GRK y de arrestinas, como recientemente se ha referido para adrenoceptores β, m_2 muscarínicos o CCR5 de quimiocinas[5,24,25]. Todos estos datos refuerzan el papel central de GRK y arrestinas en la modulación de GPCR, e indican que cambios fisiológicos o patológicos en sus valores o actividad podrán modificar la eficacia de la transducción de señales.

Mecanismos de regulación de la expresión de GRK

De lo tratado hasta ahora se deduce claramente el interés por conocer las señales y mecanismos que gobiernan la expresión de los miembros de estas familias de proteínas reguladoras en distintos tipos celulares y circunstancias fisiológicas. Nuestro laboratorio está interesado especialmente en los mecanismos que regulan la actividad transcripcional del gen GRK2 humano, así como en la estabilidad de estas proteínas en las células. Así, como se indica posteriormente, hemos investigado cómo diversos estímulos modulan la actividad del promotor de GRK2 en células del sistema cardiovascular. Por otra parte, hemos podido determinar que los valores celulares de GRK2 están estrechamente y rápidamente regulados en cunato a la degradación proteolítica por la vía del proteasoma. Es muy interesante destacar que la activación de GPCR aumenta la ubiquitinación y la velocidad de degradación de GRK2, lo que indica la importancia fisiológica de un adecuado control del complemento celular de esta cinasa (Penela et al, en prensa).

Funciones fisiológicas de GRK2

Sistema cardiovascular

Los GPCR median acciones de mensajeros esenciales para la función del sistema cardiovascular, que constituyen la diana de múltiples fármacos utilizados en el tratamiento del fallo cardíaco congestivo, la angina de pecho, o la hipertensión, enfermedades muy frecuentes y que constituyen un objetivo sanitario de primer orden. Dado que las proteínas reguladoras GRK son piezas clave del entramado regulatorio que modifica la eficacia de la transducción a través de GPCR, la hipótesis de que cambios en la actividad y/o expresión de estas proteínas sean de especial importancia fisiológica en el sistema cardiovascular resulta atractiva. Los principales datos que apoyan esta hipótesis son los siguientes:

1. La capacidad de GRK2 y otras GRK de fosforilar GPCR implicados en la función cardiovascular: β_1 y β_2 adrenérgicas, α_2-adrenérgicas, α_{1B}-adrenérgicas, angiotensina AT_1, endotelina ET-A y ET-B, etc.[5,10,26].

2. La participación de mecanismos de desensibilización de receptores en la etiología y progresión de ciertas enfermedades cardiovasculares. Así, la desensibilización de adrenoceptores β es un factor importante en pacientes con fallo cardíaco congestivo o en hipertensión[5], y se han detectado alteraciones en los valores de cierta isoforma de GRK en esas situaciones patológicas, y en otras asociadas a hipertrofia cardíaca[27-29].

3. Ratones transgénicos que sobreexpresan GRK2 presentan una importante reducción en la contractilidad cardíaca en respuesta a agonistas. Por otra parte, la sobreexpresión de un fragmento C-terminal de la cinasa que actúa como inhibidor de GRK2 endógena, incrementa la contractilidad basal y en respuesta a agonistas[30]. Todo ello confirma un importante papel de GRK2 como regulador de la función cardíaca in vivo.

4. La disrupción del gen GRK2 en ratones conduce a la muerte de los ratones homozigotos entre los días embrionarios 9 y 14, siendo el principal rasgo fenotípico una importante hi-

poplasia del miocardio[31]. Esto sugiere un papel esencial para esta cinasa en el crecimiento y la diferenciación de las células de corazón.

Todos estos datos parecen apuntar a un relevante papel de las proteínas reguladoras GRK y arrestinas en la función y disfunción del sistema cardiovascular. En este sentido, nuestro laboratorio está intentando investigar los estímulos que gobiernan la expresión de GRK2 en distintos tipos celulares cardiovasculares. Hemos podido comprobar que vías de señalización estimuladas por mensajeros "vasoconstrictores" (angiotensina, catecolaminas a través de adrenoceptores α_1 o endotelinas) aumentan la actividad transcripcional del promotor del gen GRK2 humano en células de músculo liso de aorta de rata, mientras que la transcripción disminuye en la presencia de citocinas proinflamatorias (Ramos-Ruiz y Mayor, enviado). El mejor conocimiento de los mecanismos que regulan la expresión de GRK ayudará a entender sus alteraciones en circunstancias patológicas y al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Papel de GRK en la regulación de receptores de quimiocinas

Los estudios de expresión tisular de las diversas GRK y arrestinas indicaron una notable expresión de GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 en leucocitos y distintas líneas celulares de origen mieloide y linfoide[4,32]. Se planteaba, por tanto, qué tipo de receptores constituirían la diana de regulación en estos tipos celulares. En los últimos años se han identificado numerosos GPCR que están presentes en estas células y que desempeñan un papel fundamental en procesos de respuesta inmune e inflamatoria, mediando las respuestas de mensajeros quimioatrayentes, como fMLP o C5a, o de distintos tipos de quimiocinas[33].

La activación del receptor es el paso que inicia la respuesta celular necesaria para la migración de las células en respuesta al gradiente de quimiocinas. La desensibilización del receptor también se ha propuesto como un proceso esencial para la correcta migración de la célula a través del gradiente de mensajero[34], pero se conoce muy poco tanto acerca de la transducción de la señal como de los mecanismos moleculares de desensibilización de estos receptores, especialmente los receptores de quimiocinas CC.

La abundancia e importancia funcional de los receptores de quimiocinas, y el potencial papel clave de la desensibilización en procesos de migración celular, les hace unos candidatos muy atractivos para el estudio de sus mecanismos de regulación, y se convierten en los principales candidatos para explicar los altos niveles de expresión de GRK y arrestinas en leucocitos. En los últimos 3 años, diversos laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado la capacidad de GRK2 y GRK3 de fosforilar receptores de IL-8, fMLP y de CC-quimiocinas como CCR2b y CCR5[24,34-37]. Por tanto, parece confirmarse que las proteínas GRK desempeñan un papel importante en la modulación de la respuesta de monocitos y linfocitos a quimiocinas. Otro aspecto de interés en este sentido es que estudios muy recientes indican que las quimiocinas también se producen por células no hematopoyéticas del sistema nervioso central, y que receptores de quimiocinas se expresan en astrocitos y células microgliales e incluso en neuronas; por tanto, cabe especular que estos mensajeros quimiotácticos desempeñan también un papel en las reacciones inflamatorias en el sistema nervioso, de gran importancia en situaciones patológicas[24].

BIBLIOGRAFÍA

1. Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1996; 36: 429-459.
2. Clapham DE, Neer EJ. G protein βγ subunits. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997; 37: 167-203.
3. Della Rocca GJ, Van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. J Biol Chem 1997; 272: 19.125-19.132.
4. Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, DeBlasi A. G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. Trends Pharmacol Sci 1996; 17: 416-421.
5. Mayor F Jr, Penela P, Ruiz-Gómez A. Role of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) and arrestins in β-adrenergic receptor internalization. Trends Cardiovasc Med 1998; 8: 235-241.
6. Böhm SK, Grady EF, Bunnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G protein-coupled receptors. Biochem J 1997; 322: 1-18.
7. Sterne-Marr R, Benovic JL. Regulation of G protein-coupled receptors kinases and arrestins. Vitam Hormones 1995; 51: 193-234.
8. Koenig JA, Edwardson JM. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci 1997; 18: 276-287.

9. Benovic JL, DeBlasi A, Stone WC, Caron MG, Lefkowitz RJ. β-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. Science 1989; 246: 235-246.
10. Lohse MJ, Krasel C, Winstel R, Mayor F Jr. G-protein-coupled receptor kinases. Kidney Intn 1996; 49: 1.047-1.052.
11. Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Sarasate M. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. Trends Biochem Sci 1993; 18: 343-347.
12. Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. The binding site for the bg subunits of heterotrimeric G proteins on the β-adrenergic receptor kinase. J Biol Chem 1993; 268: 8.256-8.260.
13. Pitcher JA, Touhara K, Payne E, Lefkowitz RJ. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β2-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with Gβγ subuntis and lipid. J Biol Chem 1995; 270: 707-710.
14. DebBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, Hosey MM. G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein βγ subunits. J Biol Chem 1996; 272: 22.552-22.562.
15. García-Higuera I, Mayor F Jr. Rapid desensitization of neonatal rat liver β-adrenergic receptors. A role for β-adrenergic receptor kinase. J Clin Invest 1994; 93: 937-943.
16. García-Higuera I, Penela P, Murga C, Egea G, Bonay P, Benovic JL et al. Association of the regulatory β-adrenergic rceptor kinase with rat liver microsomal membranes. J Biol Chem 1994; 269: 1.348-1.355.
17. Murga CA, Ruiz-Gómez I, García-Higuera I, Kim CM, Benovic JL, Mayor F Jr. High affinity binding of β-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation. J Biol Chem 1996; 271: 985-994.
18. Murga C, Esteban N, Ruiz-Gómez A, Mayor F Jr. The basal subcellular distribucion of β-adrenergic receptor kinase is independent of G-protein βγ subunits. FEBS Letters 1997; 409: 24-28.
19. Pitcher JA, Hall RA, Daaka Y, Zhang J, Ferguson SSG, Hester S et al. The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. J Biol Chem 1998; 273: 12.316-12.324.
20. Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization: regulation of β2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. J Biol Chem 1997; 272: 5-8.
21. Goodman OB, Krupnick JG, Santoni F, Gurevich VV, Penn RB, Cagnon AW et al. β-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β2-adrenergic receptor. Nature 1996; 383: 447-450.
22. Goodman OB, Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL, Keen JH. Arrestin/clathrin interaction. J Biol Chem 1997; 272: 15.017-15.022.
23. Ruiz-Gómez A, Mayor F, Jr. β-adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with β-adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. J Biol Chem 1997; 272: 9.601-9.604.
24. Aragay AM, Ruiz-Gómez A, Penela P, Sarnago S, Elorza A, Jiménez-Sáinz MC et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. FEBS Lett 1998; 430: 37-40.
25. Ménard L, Ferguson SSG, Zhang J, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG et al. Synergistic regulation of β2-adrenergic receptor sequestration: Intracellular complement of β2-adrenergic receptor kinase and β-arrestin determine kinectics of internalization. Mol Pharmacol 1997; 51: 800-808.
26. Palczewski K. GTP-binding-protein coupled receptor kinases: two mechanistic models. Eur J Biochem 1997; 248: 261-269.
27. Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Loshe MJ. Altered expression of β-adrenergic receptor kinase and β1-adrenergic receptors in the failing human heart. Circulation 1993; 78: 454-463.
28. Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD. G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. J Clin Invest 1997; 99: 2.087-2.093.
29. Choi D-J, Walter JK, Hunter JJ, Rockman HA. Mechanism of β-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased β-adrenergic receptor kinase. J Biol Chem 1997; 272: 17.223-17.229.
30. Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA et al. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. Science 1995; 268: 1.350-1.353.
31. Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK et al. Esential role of β-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 12.974-12.979.
32. De Blasi A, Parruti G, Sallese M. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of β-adrenergic receptor kinases 1 and 2. J Clin Invest 1995; 95: 203-210.
33. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. Annu Rev Immunol 1994; 12: 593-633.
34. Franci C, Gosling J, Tsou C-L, Coughlin SR, Charo IF. Phosphorylation by a G protein-coupled kinase inhibits signaling and promotes internalization of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor. J Immunol 1996; 157: 5.606-5.612.
35. Aramori I, Zhang J, Ferguson SSG, Bieniasz PD, Cullen BR, Caron MG. Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an

HIV-1 co-receptor. EMBO J 1997; 16: 4.606-4.616.
36. Prossnitz ER. Desensitization of N-formylpeptide receptor-mediated activation is dependent upon receptor phosphorylation. J Biol Chem 1997; 272: 15.213-15.219.
37. Aragay AM, Mellado M, Frade JMR, Martín AM, Jiménez-Sáinz MC, Martínez AC et al. Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 95: 2.985-2.990.

DISCUSIÓN

J. Moscat: ¿Es el mutante cinasa inactivo de GRK2 dominante negativo?

F. Mayor: Se puede comportar como dominante negativo si se tiene cuidado con los niveles de expresión. Este patrón de desensibilización que aparece con receptores de quimiocinas transfectados no se observa cuando se expresa el mutante K220R. El K220R contiene dominios de homología a plextrina y sitios de unión a subunidades βγ de las proteínas G que pueden interferir también en los procesos de señalización celular.

J. Moscat: ¿Habéis estudiado si se comporta como el mutante de β-arrestina que bloquea la internalización y la activación de MAPcinasa?

F. Mayor: Estamos realizando actualmente estos experimentos, aunque todavía no disponemos de resultados concluyentes.

R. Borges: El receptor β (β_1) es el típico ejemplo de receptor acoplado a la adenilato ciclasa. ¿Existe algún tipo de regulación por proteincinasa A?

F. Mayor: Efectivamente, estos receptores pueden ser también modulados por fosforilación por proteincinasas. Lo que todavía no se conoce del todo es si existe algún tipo de fosforilación jerárquica, en el sentido de que la fosforilación previa por GRK o por proteincinasa A, modifique la acción de otras cinasas. De todas maneras, existe otra posible acción de estas cinasas sobre los mecanismos de regulación, actuando sobre la expresión de estas proteínas. Se sabe, por ejemplo, que la β-arrestina incrementa su expresión en presencia de dibutiril-AMPc. Por otra parte, se sabe que efectivamente ésteres de forbol aumentan la expresión de GRK, lo que indicaría que pueden modularse. Se trataría, pues, de mecanismos que indirectamente modularían la señal, actuando sobre la actividad o la expresión de estos receptores.

J.M. Baeyens: Desde el punto de vista de la tolerancia opiácea, poder bloquear el efecto de GRK o de β-arrestina creo que sería clave. ¿Hay alguna herramienta que atraviese la membrana y sea capaz de producir este tipo de bloqueos?

F. Mayor: Por el momento no se conoce ningún inhibidor específico de GRK2 o de β-arrestinas. Se sabe que los polianiones, como la heparina, pueden inhibir in vitro la GRK2, pero no existen herramientas permeables a la membrana. Otra aproximación para bloquear estas proteínas podría ser, por ejemplo, el empleo de ratones transgénicos que sobreexpresan la zona C-terminal de la cinasa. Esto, en principio, inhibiría su translocación a la membrana y su actuación, inhibiendo la desensibilización. También se han realizado intentos con terapia génica en conejos, mediante adenovirus acoplados a esta construcción. Sin embargo, se debe tener en cuenta que este fragmento C-terminal de la cinasa puede inhibir también subunidades βγ de las proteínas G, lo que ejercería una acción muy inespecífica. Probablemente haya que conocer mejor la relación estructura-función de GRK2 para intentar diseñar algún otro tipo de inhibidores.

J.M. Baeyens: Los bloqueadores de receptores acoplados a proteína G producen una regulación al alza de sus receptores tras la administración crónica. ¿Existe alguna explicación sobre el papel de la GRK o de la β-arrestina en estas situaciones y su posible efecto, por ejemplo, sobre la internalización del receptor? De hecho, uno de los problemas de los bloqueadores dopaminérgicos en el tratamiento de la esquizofrenia es que producen una regulación al alza de los receptores dopaminérgicos, la cual genera problemas clínicos como consecuencia del tratamiento. Sería muy interesante, pues, conocer cuáles son los mecanismos implicados en este proceso y, por tanto, poder modularlo.

F. Mayor: Aunque se dispone de algunos experimentos realizados en corazón de cerdos tratados con antagonistas de los adrenoceptores β en los que se ha observado que pueden modular los valores de GRK2, creo que es preciso conocer con más detalle cómo se re-

gula la expresión de estas proteínas. Por tanto, lo que comentas es una posibilidad muy interesante pero sobre la cual todavía no existe una respuesta en la actualidad.

A. García de Herreros: Durante el desarrollo habéis visto que las GRK se expresan específicamente en las zonas de migración. Especulando sobre su posible papel, ¿crees que podrían estar involucrados negativamente en la migración de las células de esta zona, actuando a través de los receptores de quimiocinas?

F. Mayor: Es una posibilidad realmente muy interesante. En general, los mecanismos de desensibilización pueden ser relevantes en situaciones de seguimiento de gradientes quimiotácticos, es decir, cuando una célula se pone en movimiento hacia una determinada diana. Además, esta célula ha de ser capaz de corregir su trayectoria y sería en este momento cuando los mecanismos de *on/off* sucesivos podrían desempeñar un papel primordial. Es curioso observar que las GRK en general se expresan preferentemente en leucocitos, en espermatozoides y también en determinadas células migratorias durante algunos períodos embrionarios (datos todavía sin publicar). Esto sugiere esta posible relación entre receptores de sustancias quimiotácticas, la función de estas proteínas y los procesos generales de migración. Sin embargo, también existen algunos datos negativos al respecto. Si se mutan los lugares de fosforilación por esta cinasa en algunos receptores de quimiocinas, el posterior estudio de quimiotaxis que ha analizado únicamente la capacidad de migración, ha evidenciado que mantienen su capacidad migratoria. Tal vez convendría analizar también los posibles cambios de dirección en los gradientes quimiotácticos.

A. Zorzano: Me ha parecido entender que en el extremo C terminal de BARK-1 el dominio de unión $\beta\gamma$ es también un dominio PH. Desde este punto de vista, ¿tienes idea de si puede haber algún tipo de *cross-talk* entre BARK-1 o BARK-2 y PI-3 cinasa?

F. Mayor: Existe un dominio de homología plextrina que se solapa parcialmente con el dominio de unión de $\beta\gamma$. Estudios de otros grupos sugieren que la parte N-terminal del dominio de homología a plextrina interacciona con PIP-2 mientras que la zona más terminal es más relevante en cuanto a su unión a $\beta\gamma$, y que ambas interacciones de una forma sinérgica modulan la actividad de la cinasa. La posibilidad de relaciones entre PI-3 cinasa y GRK-2 resulta interesante por varias razones: por la interacción de modulación por productos de PI-3 cinasa sobre la actividad GRK-2 y por otras derivaciones también en el contexto del papel de arrestinas y de la propia GRK-2 en la transducción de señales. En este momento estamos trabajando en intentar ver posibilidades de interacción entre PI-3 cinasa y algunos de los componentes del sistema que he mencionado.

V. Sánchez Margalet: Volviendo al tema de regulación de GRK-2, parece que la subunidad α es más importante para la activación y, sin embargo, hay un dominio PH en $\beta\gamma$ que podría ser responsable de la localización. ¿Hay algún tipo de especificidad por parte de las diferentes familias de proteínas G, y en concreto con diferentes combinaciones de subunidades α y $\beta\gamma$?

F. Mayor: Por un lado, me gustaría precisar que el efecto sobre las GRK por parte de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G es un efecto sobre la actividad, fundamentalmente porque permite la translocación de la cinasa desde el citosol a la membrana. En este sentido las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G únicamente regulan GRK2 y GRK3, que son las que tienen este dominio. No está claro si existe una especificidad de determinadas combinaciones de subunidades $\beta\gamma$ que sean más o menos eficaces en producir estos efectos. Por otro lado, he comentado el efecto que puede tener la cotransfección de ciertas subunidades α, no sobre la actividad sino sobre la expresión, sobre la actividad transcripcional del promotor del gen GRK2. No se ha descrito un efecto directo de interacción entre las α y estas GRK.

V. Sánchez Margalet: Dada la reciente publicación de datos sobre animales transgénicos que sobreexpresan α_q en tejido miocárdico y que presentan hipertrofia cardíaca, ¿crees que el efecto hipertrófico podría deberse a la sobreexpresión de GRK y de arrestina, secundario a la sobreexpresión de α_q?

F. Mayor: Creo que, efectivamente, es una posibilidad muy interesante. Los animales que sobreexpresan α_q presentan unas características de frecuencia cardíaca y una alteración en el patrón de desensibilización de algún tipo de receptores acoplados a proteínas G en los que pensamos que un factor que pudiera contribuir es la alteración secundaria en los valores de GRK-2.