

ACTIVACIÓ DE LES FOSFOLIPASES C I D PER NEUROTRANSMISSORS

ELISABET SARRI, JOAN MARC SERVITJA, ROSER MASGRAU, ENRIQUE CLARO I FERNANDO PICATOSTE

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona.

Adreça per a la correspondència: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona.

INTRODUCCIÓ

Els fosfolípids de les membranes cel·lulars compleixen un paper fonamental en el manteniment de l'estructura i la compartició cel·lular, gràcies a la seva naturalesa molecular amfipàtica, i cada cop més són observats des de la perspectiva de la transducció de senyals com a precursors de missatgers intracel·lulars. Diverses fosfolipases, sensibles a l'activació per neurotransmissors i altres estímuls extracel·lulars, catalitzen la seva hidròlisi trencant enllaços èster o fosfoèster, i l'acció, com a segons missatgers, dels productes que en poden derivar permet dibuixar una xarxa d'esdeveniments que se succeeixen i s'entrellacen configurant una part important del complex comandament del metabolisme i de les funcions cel·lulars. En aquest capítol tractarem alguns aspectes relacionats amb la intervenció de les fosfolipases C de fosfoinosítids (PLC) i de les fosfolipases D (PLD) en sistemes de transducció.

Característiques enzimàtiques de les fosfolipases C i D

Primerament observarem la PLC i la PLD com a dos enzims i en destacarem algunes característiques (Figura 1). Tots dos enzims, localitzats tant a la membrana com al citosol, trenquen glicerofosfolípids hidrolitzant un enllaç fosfoèster. La PLC actua entre el fosfat i el glicerol, i dona lloc a la formació de diacilglicerol (DAG) com a producte lipídic, i del cap polar amb el fosfat unit com a producte soluble. Un substrat ben establert de la PLC és el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PtdIns4,5P₂), si la PLC hidrolitza també, en la cèl·lula viva, el fosfatidilinositol (PtdIns) i el fosfatidilinositol 4-fosfat (PtdIns4P) no és tan clar (Majerus, 1992). La transcendència d'aquesta qüestió es fonamenta en el fet que malgrat que el DAG és un producte comú, amb funcions de segon missatger, els metabòlits solubles que s'obtenen de la hi-

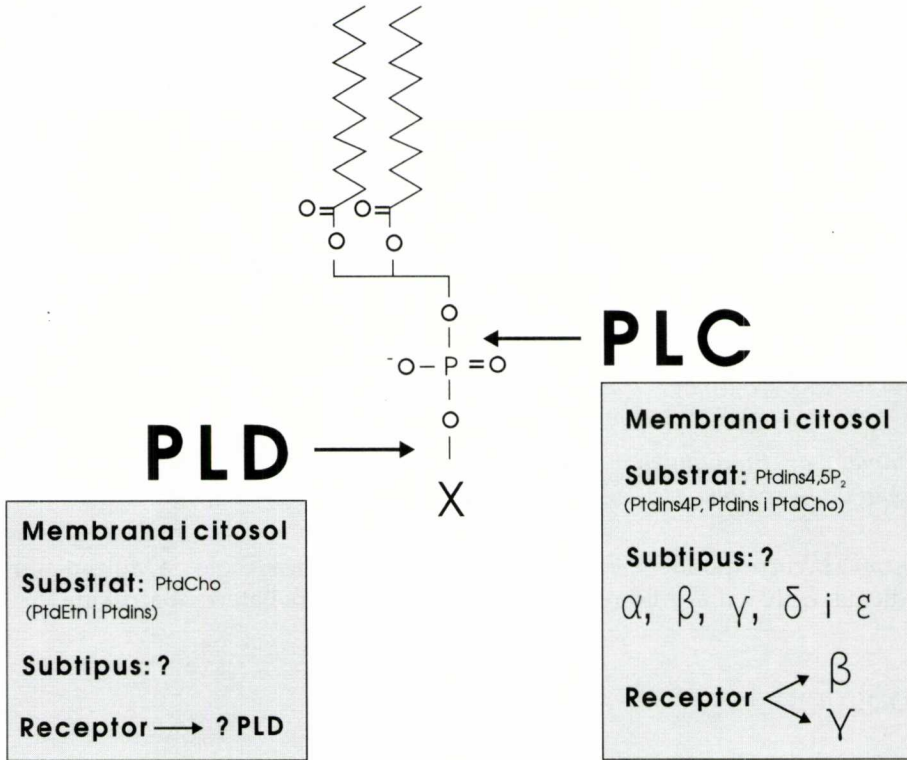


FIGURA 1. Característiques de les fosfolipases C i D.

dròlisi de cadascun dels fosfoinosítids esmentats són inositols fosfats (InsPs) diferents i, entre ells, només l'inositol 1,4,5-trisfosfat (Ins1,4,5P₃), producte del trencament del PtdIns4,5P₂, funciona com a segon missatger. Per tant, la hidròlisi tant del PtdIns com del PtdIns4P podria generar un senyal cel·lular desencadenat per l'acció del DAG però deslligat dels efectes cel·lulars de l'Ins1,4,5P₃.

La PLD, tot i trencar un enllaç del mateix tipus que la PLC, hidrolitza la unió del cap polar i el fosfat fent que el producte lipídic sigui l'àcid fosfatídic (PtdOH) i el cap polar lliure del fosfat, el producte soluble. El principal fosfolípid hidrolitzat per la PLD és la

fosfatidilcolina (PtdCho), però tant la fosfatidiletanolamina (PtdEtn) com el fosfatidilinositol (PtdIns) s'han proposat també, en alguns sistemes, com a substrats d'aquesta fosfolipasa (Exton, 1994b).

S'han aïllat i caracteritzat bioquímicament cinc grups d'isoenzims de la PLC (α, β, γ, δ i ε) i es coneix l'estructura primària dels β, γ i δ, que són els més abundants al cervell, però només els β i els γ són sensibles a l'activació de receptors (Lee i Rhee, 1995). La diversitat molecular de la PLD de moment només és una sospita basada en algunes diferències observades en l'especificitat de substrat, la localització subcel·lular i la sensibilitat d'aquesta activitat a diferents factors modu-

ladors (Exton 1994b); però la caracterització molecular, útil en la identificació de diferents isoenzims, tot just acaba de començar i no és el moment de dir quins són els que s'estimulen mitjançant l'activació de receptors (Morris *et al.*, 1996).

Les fosfolipases C i D com a sistemes efectors

Contextualitzar la PLC en l'engranatge d'un mecanisme transductor és acceptat i

habitual, i ens serveix d'exemple l'estimulació d'aquesta activitat que senyals extracel·lulars de naturalesa molt diversa (hormones, neurotransmissors, factors de creixement, immunoglobulines, etc.) provoquen en la majoria de teixits i la gran varietat de respostes cel·lulars on participa. Quan la PLC hidrolitza el PtdIns4,5P₂ es genera Ins1,4,5P₃ i DAG (Figura 2). El primer mobilitza Ca²⁺ emmagatzemat en vesícules del reticle endoplasmàtic, i augmenta la seva concentració citosòlica (Berridge, 1993), mentre que el segon activa diferents isoen-

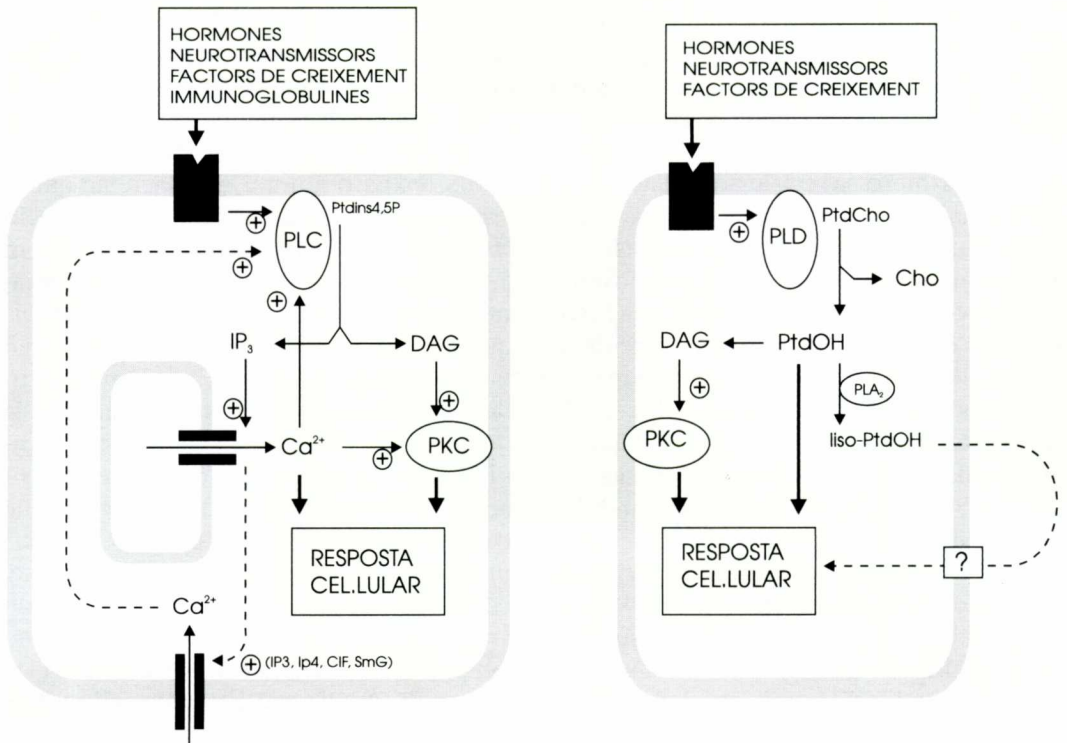


FIGURA 2. Fosfolipases C i D com a sistemes efectors.

zims de la proteïna cinasa C (PKC), alguns dels quals també són activables pel Ca^{2+} (Nishizuka, 1995). Aleshores, la resposta cel·lular deriva de la modulació que per fosforilació pot exercir la PKC, juntament amb l'acció directa o indirecta del Ca^{2+} sobre enzims del metabolisme cel·lular. Aquest sistema transductor disposa d'un mecanisme amplificador que té com a base la sensibilitat de la PLC pel Ca^{2+} i es desencadena en bona part per l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular provocada pel buidatge dels seus dipòsits intracel·lulars (Clapham, 1995). Com que el Ca^{2+} és un activador de la PLC, després de l'influx del catió hi pot haver una nova producció d'Ins1,4,5P₃ que amplifica el cicle, ja que simultàniament s'haurien reomplert els compartiments de Ca^{2+} intracel·lulars.

Dins d'aquest apartat introductorí també farem esment del metabolisme que sofreixen els segons missatgers que genera la PLC, un mecanisme desactivador del sistema transductor, amb el qual són reciclats cap a la formació de nous fosfoinosítids (Majerus, 1992). Ens interessa revisar aquest punt perquè bona part dels estudis que hem fet al nostre laboratori s'ha basat en l'anàlisi dels intermediaris del cicle dels fosfoinosítids que s'accelera com a conseqüència de l'estimulació de la PLC. Dos enzims diferents, la Ins1,4,5P₃ 3-cinasa, que dona lloc a la formació d'Ins1,3,4,5P₄, i la inositol polifosfat 5-fosfatasa, que forma Ins1,4P₂, inicien les dues rutes alternatives del metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ (Figura 3). Aleshores, ambdós productes sofreixen desfosforilacions successives fins a inositol lliure que la cèl·lula pot reciclar cap a la síntesi de PtdIns. Cal comentar que el Li^+ inhibeix tant l'enzim que allibera el fosfat de la posició 1 de l'inositol com el que hidrolitza qualsevol dels inositols monofosfats, fet que ha donat lloc a una teoria per explicar les seves accions terapèutiques en la depressió bipolar (Jope i Williams, 1993) i ha permès desenvolupar

tècniques per determinar l'activitat PLC mesurant l'acumulació d'InsPs. El reciclatge del PtdIns també incorpora la branca lipídica dels productes de la PLC ja que el DAG es converteix en PtdOH al reticle endoplasmàtic per acció de la DAG cinasa, aquest s'activa transformant-se en CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) per la CTP-fosfatidat citidil transferasa, i finalment la PtdIns sintasa (CDP-diacilglicerol: mio-inositol fosfatidil transferasa) s'encarrega d'unir la branca soluble i lipídica en la síntesi de PtdIns, principalment al reticle endoplasmàtic. Després, dues fosforilacions successives del PtdIns, primer a la posició 4 i seguidament a la 5 de l'anell d'inositol, permeten la síntesi de PtdIns4P en vesícules relacionades amb el trànsit de membranes, i de PtdIns4,5P₂ a la membrana plasmàtica. L'existència de fosfatases tant del PtdIns4,5P₂ com del PtdIns4P faciliten interconversions recíproques entre els diferents fosfoinosítids.

Quant a la PLD, també és llarga la llista de senyals extracel·lulars que l'activen en molts teixits (Figura 2) i, concretament al sistema nerviós, s'allarga cada cop més (Klein *et al.*, 1995), però una anàlisi de la PLD com a sistema efector paral·lel al de la PLC encara és una mica agosarat. De fet, són pocs els que dubten de la participació de la PLD en mecanismes transductors, però cal ser prudents en qualificar-la de sistema efector, ja que és necessari caracteritzar millor el mecanisme que la pugui relacionar directament amb l'activació de receptors i el paper que com a segons missatgers podrien tenir els productes de la seva acció. No obstant això, l'esquema proposat és el de la Figura 2, on s'observa que de la hidròlisi de la PtdCho per part de la PLD, en resulten el PtdOH i la colina. El PtdOH pot funcionar ell mateix com a segon missatger, implicat en processos mitogènics (Exton, 1994a), o ser el precursor del DAG, per acció de l'enzim fosfatidat fosfatasa, i aleshores, de l'un, de l'al-

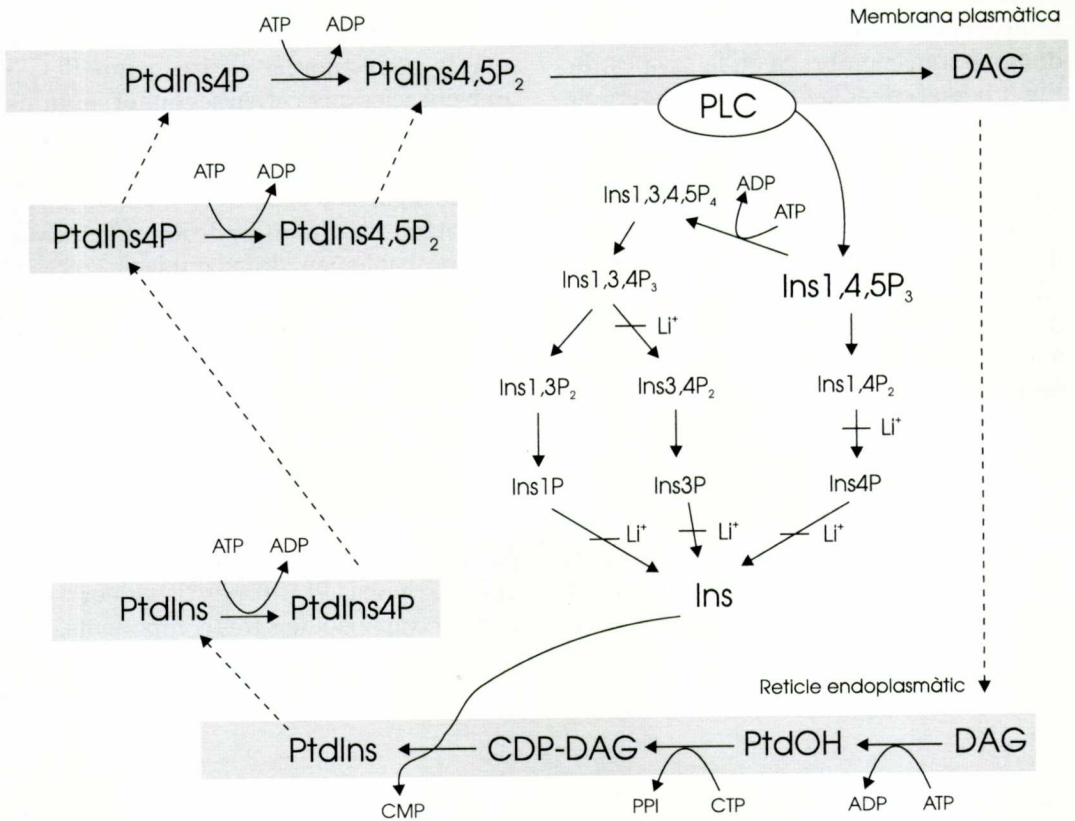


FIGURA 3. Cicle dels fosfoinosítids.

tre o de tots dos deriva la resposta cel·lular. Si simultàniament actua una fosfolipasa A_2 sobre el PtdOH es pot formar liso-PtdOH, que s'allibera ràpidament de la cèl·lula i, entre altres funcions, pot intervenir en la resposta cel·lular d'una forma autocrina sense que de moment es conegui el possible receptor.

Mecanismes d'activació de les fosfolipases C i D

Havent vist, en general, els esdeveniments cel·lulars posteriors a l'acció de les fosfolipases C i D, ara ens fixarem més concretament en els mecanismes genèricament anomenats transductors, responsables de

l'activació d'aquests dos enzims per receptors (Figura 4).

Molts dels receptors de membrana constituïts per una cadena polipeptídica amb set dominis transmembrana en la seva estructura poden activar la PLC mitjançant proteïnes G trimèriques. Aquestes proteïnes segueixen un cicle funcional comú (Neer, 1995), que breument seria el següent: la unió específica de l'agonista amb el receptor provoca un canvi conformacional en el receptor que afavoreix la formació d'un complex ternari d'alta afinitat: l'agonista, el receptor i la proteïna G. Aleshores, la subunitat α de la proteïna G intercanvia GTP pel GDP que tenia unit i això promou la dissociació de la proteïna G en les subunitats α i $\beta\gamma$, i la d'aquestes respecte al receptor. La subunitat α amb el GTP unit activa el sistema efector fins que l'activitat GTPasa, pròpia de la subunitat α , hidrolitza el GTP i torna a l'estat basal unint-se al dímer $\beta\gamma$, que, al seu torn, pot haver

activat el mateix sistema o altres sistemes efectors. Un nombre important d'experiments *in vitro* han demostrat que la subunitat α de les proteïnes de la família $G_{q/11}$ unida a GTP, pot estimular els isoenzims PLC- β amb eficàcies que varien segons el subtipus d'aquests isoenzims que s'hagin utilitzat, reconstituït o expressat (Lee i Rhee, 1995). També a partir d'experiments similars s'ha descrit que els dímers $\beta\gamma$ de les proteïnes G, molt probablement de la família $G_{i/o}$, poden activar els diferents subtipus de la PLC- β , encara que amb un ordre d'eficàcies diferent de l'obtingut amb les subunitats α (Sternweiss, 1994; Lee i Rhee, 1995). Com a reflexió sobre els mecanismes d'activació de la PLC associats a receptors de set dominis transmembrana, emfasitzarem que hi ha molts estudis que descriuen la interacció o bé del receptor amb la proteïna G_q , o bé de la subunitat α amb la PLC- β , però l'evidència clara de la connexió dels tres components, és a

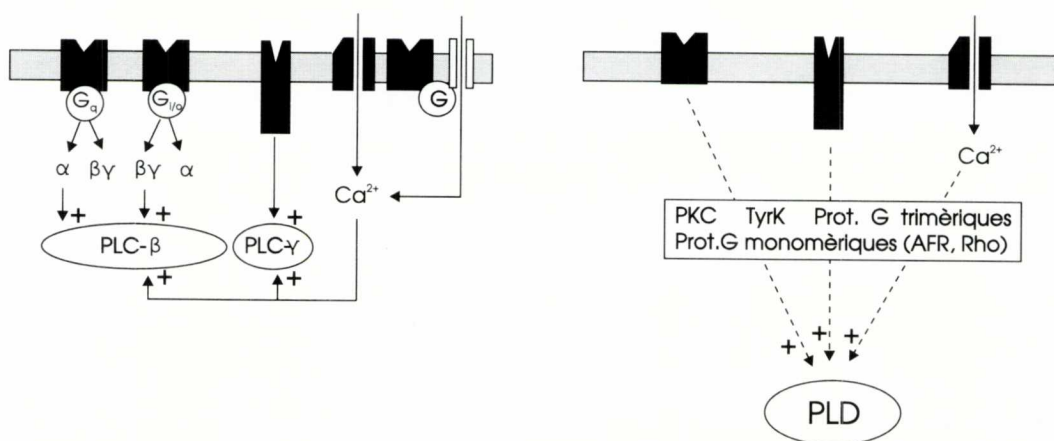


FIGURA 4. Mecanismes d'activació de les fosfolipases C i D.

dir, receptor, proteïna G_q i PLC- β en el procés de transducció, només s'ha descrit per al cas dels receptors muscarínics de l'acetilcolina (Berstein *et al.*, 1992). Per a altres receptors de la mateixa família se suposa el mateix mecanisme transductor sobre la base de l'homologia estructural entre els receptors d'aquest conjunt que estimulen la PLC.

Al marge de l'activació per mitjà d'una proteïna G, hi ha dos mecanismes addicionals d'estimulació de la PLC. D'una banda, els receptors de membrana amb activitat tirosina cinasa en el domini citoplasmàtic de la seva estructura, com els receptors de factors de creixement, fosforilen en tirosines la PLC- γ i com a resultat d'aquesta modificació l'activen (Lee i Rhee, 1995). De l'altra banda, i com a conseqüència d'una gran varietat de fenòmens que poden produir-se a nivell de la membrana plasmàtica d'una cèl·lula, l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular pot activar els isoenzims β i γ de la PLC (Eberhard i Holz, 1988). Així doncs, l'activació de receptors-canals permeables a aquest catió, o l'obertura d'un canal de Ca^{2+} connectada amb un receptor de set dominis transmembrana mitjançant una proteïna G, també es poden incloure en els mecanismes activadors de la PLC. De totes maneres cal subratllar que l'últim dels mecanismes mencionats existeix gairebé només en forma d'hipòtesi.

Pel que fa als transductors que acoblen diversos receptors i la PLD, de moment es pot dir que poden ser molts però encara no n'hi ha cap de clar. Com a candidats, perquè són bons activadors de la PLD, hi trobem la PKC, tirosines cinases, proteïnes G trimèriques, proteïnes G monomèriques com les Rho o el factor d'ADP-ribosilació, una proteïna de la família Ras coneguda prèviament per la seva participació en el trànsit intracel·lular de membranes i en l'activació irreversible de les proteïnes G_s per la toxina colèrica, i fins i tot el Ca^{2+} , però en aquest últim cas no sembla que es tracti d'un efecte

directe de l'ió sobre l'enzim (Exton, 1994b; Klein *et al.*, 1995). Tenint en compte que tant la PKC com el Ca^{2+} augmenten l'activitat PLD i que molts senyals activadors de la PLC també ho són de la PLD, s'ha proposat que, almenys en alguns casos, l'estimulació de la PLD podria ser una conseqüència de l'activació de la PLC, ja que aquesta última fosfolipasa genera missatgers que activen la PKC i augmenten la concentració de Ca^{2+} intracel·lular.

LÍNIES DE TREBALL DEL NOSTRE GRUP

Dins el camp ampli de l'estudi de la senyalització cel·lular roman permanentment plantejada una qüestió global que podríem formular més o menys encertadament així: Com pot ser que un nombre relativament discret de mecanismes transductors, engranatges senzills o complexos d'episodis successius, que conflueixen en l'augment d'un nombre encara més discret de missatgers intracel·lulars, puguin explicar les relacions tan específiques que hi ha entre un conjunt molt gran i divers de senyals extracel·lulars i un altre conjunt encara més gran i més divers de respostes cel·lulars? Malgrat que limitem el camp d'estudi a aquells sistemes transductors que tenen com a sistema efector la PLC o potencialment la PLD, que tenen lloc al cervell i que són activats per receptors de neurotransmissors amb set dominis transmembrana a la seva estructura, la qüestió segueix plantejada i en intentar desenvolupar-la en sorgeixen, en conseqüència, algunes més. És, potser, que la idiosincràcia de cada cèl·lula, és a dir, el conjunt concret d'enzims responsables del seu metabolisme, respon a l'augment dels mateixos missatgers secundaris d'una forma diferent? O és que els mecanismes transductors tot i seguir un esquema general comú tenen ma-

tisos diferents segons siguin activats per diferents receptors i/o es desencadenin en un tipus cel·lular o en un altre?. I encara més: Pot ser que una determinada resposta cel·lular sigui el resultat metabòlic que provoca l'encreuament de diferents mecanismes transductors, aportant cadascun d'ells una intensitat concreta a la resposta i fent que el conjunt sigui únic? Una combinació de la segona i la tercera qüestió que acabem d'exposar però plantejada afirmativament ens ha servit d'hipòtesi general per al començament del nostre treball. A favor d'aquesta hipòtesi, la variabilitat dels components que conformen l'engranatge transductor i la promiscüitat de les seves interaccions, que ens empeny a reexaminar sistemes de transducció, com el de l'activació de la PLC, amb un esquema general establert, hi ha evidències cada vegada més clares i extenses.

En el cas de la PLC, entre tot el que s'ha descrit sobre l'enzim o sobre el mecanisme de transducció acoblat als receptors de set dominis transmembrana, del qual forma part com a sistema efector, vam destriar diversos punts sense resoldre que defineixen els objectius concrets del nostre treball. L'especificitat de la PLC pels diferents fosfoinosítids és controvertida i de fet es coneix poc la hidròlisi d'aquests substrats si són endògens. En teixit cerebral humà hi ha dificultats metodològiques per a l'estudi de la funcionalitat de l'acoblament entre els receptors i la PLC. Quant al mecanisme d'activació de la PLC associat a receptors de la família estructural dels acoblats a proteïnes G, si bé en alguns d'ells està ben definit a nivell molecular (cas dels muscarínics de l'acetilcolina), en d'altres s'ha inferit moltes vegades sobre la base de la seva estructura i per analogia amb els de la mateixa família. En aquest cas, i pel que fa al sistema nerviós, hi ha pocs treballs que abordin la qüestió en teixit intacte. Finalment, la relació entre el sistema transduc-

tor acoblat a la PLC i l'activitat PLD està en procés de descripció com, de fet, ho està la mateixa PLD. Amb la intenció d'aprofundir sobre tots els punts que acabem d'esmentar, estem portant a terme els estudis que comentem breument a continuació.

Especificitat de substrat de la fosfolipasa C

L'interès sobre aquest punt està en el fet que, com hem esmentat, del percentatge d'hidròlisi dels diferents fosfoinosítids (PtdIns, PtdIns4P i PtdIns4,5P₂) deriva la relació de productes solubles (InsPs) formats i, com que només l'Ins1,4,5P₃ és capaç de mobilitzar Ca²⁺ de compartiments intracel·lulars, això podria implicar una activació de la PKC pel DAG, el producte comú, deslligada del senyal de Ca²⁺ en el cas de la hidròlisi de PtdIns i de PtdIns4P. Com a dades prèvies, centrant-nos en el sistema nerviós, disposàvem de treballs que descrivien tant la hidròlisi dels dos polifosfoinosítids (PtdIns4P i PtdIns4,5P₂) (Batty i Nahorski, 1992), com únicament del PtdIns4,5P₂ (Fisher *et al.*, 1990), en tots dos casos utilitzant cèl·lules senceres i mesurant els InsPs formats en temps curts. No obstant això, resultats del nostre grup ens indicaven que la hidròlisi de tots tres fosfoinosítids era possible en una preparació de membranes d'escorça cerebral de rata quan es presentaven els substrats radioactius exògenament i s'estimulava la PLC amb l'agonista muscarínic carbacol (Cch) en presència de GTPγS, un anàleg no hidrolitzable del GTP necessari per a l'activació de les proteïnes G (Claro *et al.*, 1989). Ens vam preguntar si els resultats serien iguals utilitzant substrats endògens en el mateix sistema, és a dir, si la PLC podria hidrolitzar igualment els diferents fosfoinosítids propis de la membrana pre-marcats amb [³H]inositol en el teixit encara intacte.

Vam utilitzar la mesura dels diferents InsPs acumulats, separant-los amb HPLC,

en una preparació de membranes per abordar aquesta qüestió ja que un estudi similar en cèl·lules senceres comporta impediments experimentals difícils d'evitar. En primer lloc, intentar mesurar la disminució de cada fosfoinosítid com a reflex de la seva hidròlisi és conflictiu perquè, almenys els polifosfoinosítids, es troben en quantitats molt petites i és difícil inhibir l'acció de les cinases i fosfatases que els interconverteixen contínuament. En segon lloc, el metabolisme dels InsPs en una preparació de membranes és molt més senzill que en una cèl·lula intacta i facilita la identificació dels substrats que els han originat (Figura 5). La diferència els dos sistemes està determinada per la $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ -3-cinasa, un enzim soluble que no actua en una preparació de mem-

branes. Aleshores, si detectem la formació d'Ins1P en una preparació de membranes sabem que només pot provenir de la hidròlisi del PtdIns, però en una cèl·lula el seu origen és més confús perquè també és un producte del metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ i si detectem la producció d'Ins4P i Ins1,4P₂ en tots dos sistemes poden ser el reflex de la hidròlisi dels dos polifosfoinosítids.

Primer de tot vam investigar la hidròlisi de l' [³H]PtdIns (acumulació de [³H]Ins1P) per una banda, i la hidròlisi conjunta dels dos ³H-polifosfoinosítids (acumulació de [³H]Ins4P i [³H]Ins1,4P₂) per l'altra, després d'estimular la PLC amb GTPγS sol o juntament amb Cch en funció de la concentració de Ca²⁺ lliure durant l'assaig, en presència o absència d'ATP, necessari en la síntesi dels

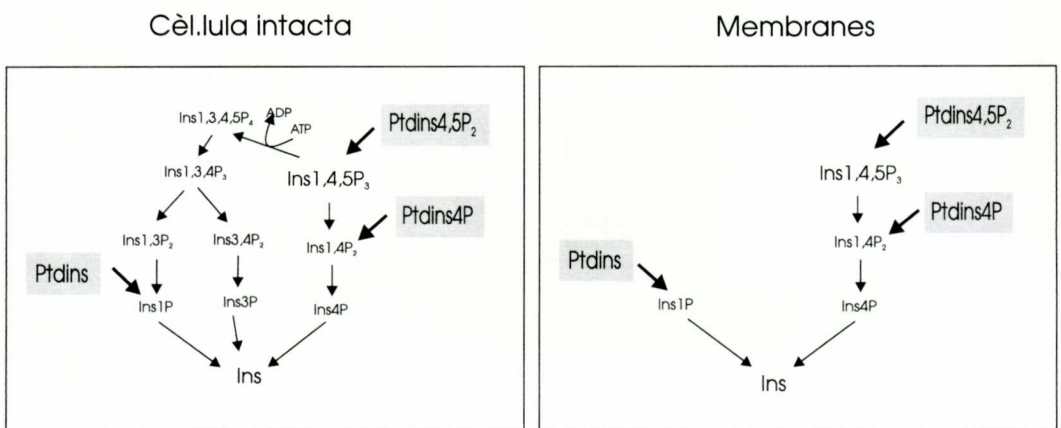


FIGURA 5. Metabolisme dels inosítils fosfats en el teixit intacte i en preparacions de membranes.

polifosfoinosítids, i tant utilitzant membranes premarcades amb $[^3\text{H}]$ inositol, com exposant exògenament $[^3\text{H}]\text{PtdIns}$ a membranes no marcades radioactivament (Figura 6). A les quatre gràfiques de l'esquerra de la figura 6 es pot observar que la hidròlisi de $[^3\text{H}]\text{PtdIns}$ és evident si s'utilitza substrat exogen, però inexistent quan el substrat és endogen. En el primer cas augmenta si incrementa el Ca^{2+} descrivint l'activació de la PLC pel propi Ca^{2+} . La hidròlisi dels ^3H -

polifosfoinosítids és alta tant si són exògens com endògens, i evidentment en presència d'ATP perquè es puguin sintetitzar. La primera conclusió seria, doncs, que quan els fosfoinosítids són endògens, la PLC estimulada en les condicions utilitzades només hidrolitza els polifosfoinosítids.

A continuació ens preguntarem quina seria la contribució de cada polifosfoinosítid en l'acumulació total de ^3H -InsPs però es van presentar alguns problemes metodolò-

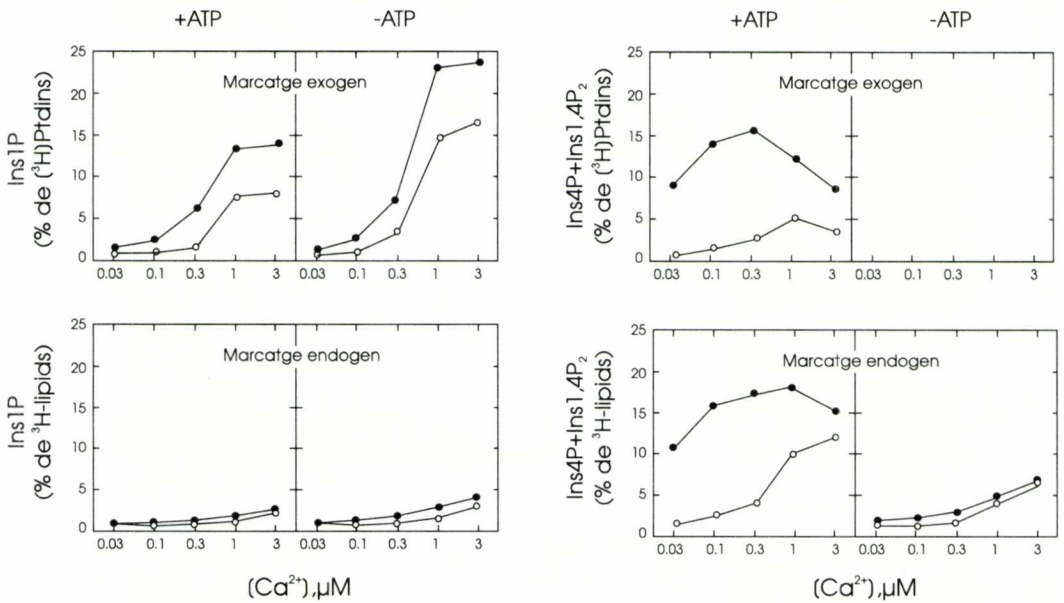


FIGURA 6. Hidròlisi dels fosfoinosítids en membranes d'escorça cerebral de rata. Comparació dels productes formats a partir de $[^3\text{H}]\text{PtdIns}$ exogen i de ^3H -fosfoinosítids endògens. Membranes no premarcades, incubades amb $[^3\text{H}]\text{PtdIns}$ (marcatge exogen) i membranes premarcades amb $[^3\text{H}]\text{inositol}$ (marcatge endogen) van ser incubades amb ATP i sense, amb (●) i sense (○) $1\mu\text{M}$ $\text{GTP}\gamma\text{S}$ i 1mM carbacol i amb les concentracions de Ca^{2+} indicades. Els diferents ^3H -InsPs formats foren separats per HPLC. Els resultats representen la formació dels diferents InsPs com a percentatge dels respectius ^3H -fosfoinosítids precursors en cada condició experimental.

gics d'entrada. Mesurar la velocitat d'hidròlisi de l' $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ mitjançant la producció de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ és difícil, ja que aquest es desfosforila molt ràpidament cap a la formació de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4\text{P}_2$ per acció de la inositol polifosfat 5-fosfatasa. Conseqüentment la producció de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4\text{P}_2$ tampoc no pot ser una mesura encertada de la velocitat d'hidròlisi de l' $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4\text{P}$ perquè també té l'origen en el metabolisme de l' $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$, tal com acabem d'esmentar. Per solucionar aquest conflicte experi-

mental vam mesurar, de fet, les velocitats d'aparició tant de l' $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ com de l' $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4\text{P}_2$ en membranes premarcades amb $[^3\text{H}]\text{inositol}$, però en presència d' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ no marcat per impedir el metabolisme del radioactiu. En aquestes condicions, la formació de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ reflectia la hidròlisi de l' $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ i la de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4\text{P}_2$ i la de l' $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4\text{P}$. A la gràfica principal de la figura 7, s'expressa la producció de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ com a percentatge de les velocitats de producció del

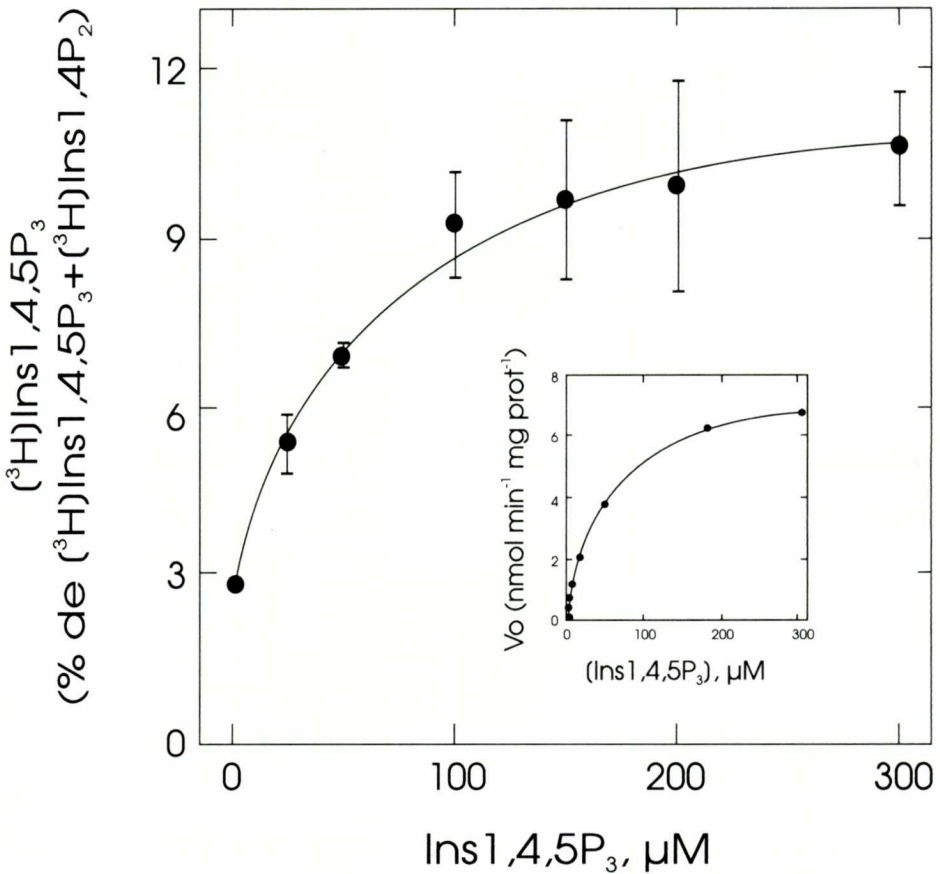


FIGURA 7. Velocitat relativa de formació de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ en membranes premarcades amb $[^3\text{H}]\text{inositol}$ i estimulades amb $\text{GTP}\gamma\text{S}$ i carbacol. Els resultats representen la formació de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ com a percentatge de la formació de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ + $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4\text{P}_2$, en funció de la concentració d' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ no marcat afegit per inhibir la hidròlisi de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$.

mateix $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ i $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4\text{P}_2$ sumades, en funció de concentracions creixents d' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$. A la gràfica inserida hi ha la cinètica de saturació de la inositol polifosfat 5-fosfatasa, que desfosforila l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$. És important observar que la gràfica principal arriba a un màxim quan la concentració d' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ és la mateixa que satura la inositol fosfat 5-fosfatasa (gràfica inserida), i això implica que en aquestes condicions no es metabolitza significativament l' $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$. Fins aquí podem deduir que aquest punt màxim, amb un valor asimptòtic estimat del 12,5 %, ens indica la velocitat d'hidròlisi del PtdInsP_2 (producció de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$) com a percentatge de la suma de les velocitats d'hidròlisi de l' $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ i de l' $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4\text{P}$ (producció de $[^3\text{H}]\text{Ins}1,4,5\text{P}_3 + [^3\text{H}]\text{Ins}1,4\text{P}_2$). Si tenim en compte que, en el sistema utilitzat, el contingut de $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$, com a percentatge dels ^3H -polifosfoinosítids totals, té un valor proper al 12,5 %, això significa que, en percentatge, la velocitat d'hidròlisi de cadascun dels ^3H -polifosfoinosítids reflecteix el seu contingut. Aleshores, com a segona conclusió, podem enunciar que tant l' $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ com l' $[^3\text{H}]\text{PtdIns}4\text{P}$ endògens d'una preparació de membranes són metabolitzats per la PLC amb la mateixa eficàcia.

Els resultats d'aquest treball (Claro *et al.*, 1993c) recomanen cautela a l'hora de treure conclusions en estudis sobre l'especificitat de substrat de la PLC, en confirmar que la seva forma de presentació durant l'assaig pot determinar-ne el resultat. Si bé descartem força clarament la hidròlisi del PtdIns endogen d'una preparació de membranes, un resultat que podria ser extrapolable a una cèl·lula intacta, obren la possibilitat que el $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ i el $\text{PtdIns}4\text{P}$ puguin ser hidrolitzats per la PLC indistintament. Per tant, permeten pensar que en cèl·lules diferents, en funció de l'accessibilitat sobretot

del $\text{PtdIns}4\text{P}$ per la PLC, la relació entre l'activació de la PKC pel DAG i el senyal de Ca^{2+} pot tenir matisos diferents.

Mesura de l'activació de la PLC per neurotransmissors en cervell humà

L'experiència metodològica en la determinació de l'activació de la PLC en preparacions de membranes cerebrals que havíem acumulat en treballs com l'anterior i en d'altres precedents, ens va permetre revisar críticament les diferents tècniques analítiques (Claro *et al.*, 1993b, 1995) i validar un procediment experimental per mesurar l'estimulació de la hidròlisi de fosfoinosítids en mostres de cervell humà *post mortem* (Sarri *et al.*, 1994). Aquesta possibilitat, d'interès elevat, havia estat dificultada per dos tipus de limitacions. D'una banda, el premarcatge de miniprismes amb $[^3\text{H}]\text{inositol}$ per mesurar la formació de $[^3\text{H}]\text{InsPs}$ tant en els mateixos miniprismes, com en membranes preparades a partir del teixit premarcat, requereix obtenir el teixit viu, immediatament *post mortem*, la qual cosa no és possible, en general, en el cas de mostres humanes. De l'altra, l'ús de preparacions de membranes de teixit obtingut per autòpsia un cert temps després de la mort pot permetre mesurar l'activitat PLC de membrana enfront de substrats exògens marcats, però presenta l'inconvenient, com hem vist a l'apartat anterior, que en aquest cas l'enzim no mostra la mateixa especificitat de substrat que quan hidrolitza els seus substrats naturals: els fosfoinosítids endògens.

Aquests problemes van ser superats amb una nova estratègia experimental per marcar els fosfoinosítids endògens amb $[^3\text{H}]\text{inositol}$ en membranes preparades a partir de mostres d'escorça cerebral humana obtingudes de 8 a 12 hores *post mortem*. El procediment aprofita la reversibilitat de la reacció catalitzada per la PtdIns sintasa:

CDP-DAG + inositol \rightleftharpoons PtdIns + CMP, de forma que incubant les membranes amb CMP s'allibera l'inositol del PtdIns endogen, el qual es marca radioactivament quan es torna a formar a partir de l^[3H]inositol afegit al medi. La presència d'ATP permet que també es marquin els dos polifosfoinosítids. Amb aquest procediment, i després de confirmar que les característiques cinètiques de la PtdIns sintasa de cervell humà són semblants a les que previament havien estat descrites en cervell de rata, vam determinar la formació de ^[3H]InsPs com a conseqüència de l'activació de la PLC a través d'una proteïna G: el GTP γ S l'estimula d'una forma dependent de la concentració i aquesta activació és potenciada per

l'agonista muscarínic Cch (Figura 8). Altres agonistes muscarínics, com l'oxotremorina, i també la serotonina (5-HT), produeixen un efecte similar, que indica que l'acoblament dels receptors muscarínics i dels de la 5-HT amb la PLC es conserva en membranes de cervell humà *post mortem*. Aquests resultats validen una metodologia per a l'estudi de l'estat funcional dels receptors acoblats a la PLC en mostres de cervell humà i, per tant, permeten complementar les mesures, més habituals, de la densitat de receptors per tècniques de fixació de radiolligands i aprofundir en la comprensió de les alteracions dels sistemes de receptors de neurotransmissors associats a patologies neurològiques i psiquiàtriques.

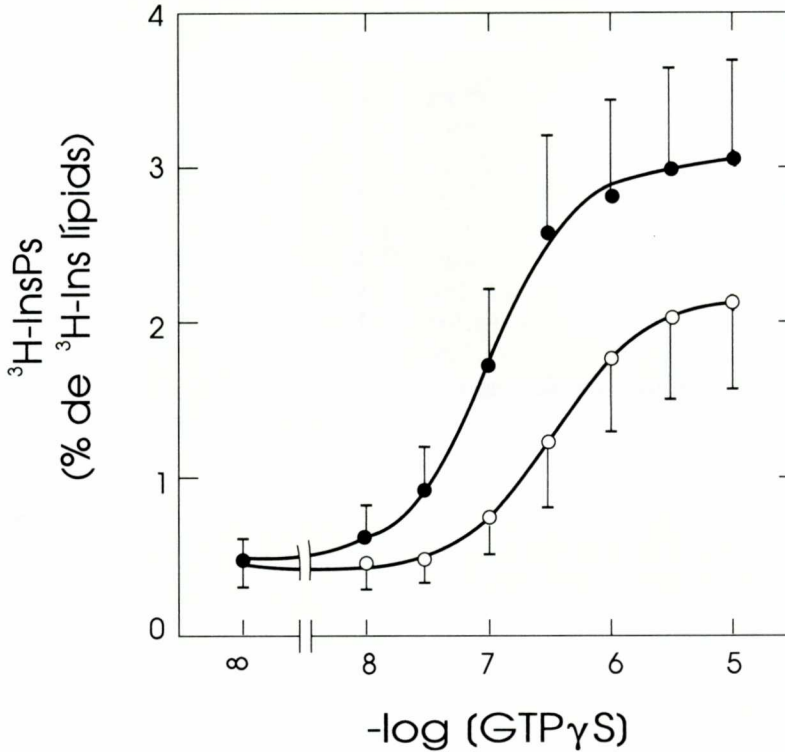


FIGURA 8. Relació concentració-efecte en l'estimulació de la PLC per GTP γ S en membranes d'escorça cerebral humana i efecte del carbacol. Les membranes van ser premarcades directament amb ^[3H]inositol en presència de CMP i incubades amb les concentracions indicades de GTP γ S, sense (o) i amb 1 mM carbacol (●).

Mecanisme d'activació de la PLC per receptors de neurotransmissors

Amb la intenció de matisar o redefinir sistemes transductors més o menys ben coneguts, buscant l'origen de la diversitat de respostes que s'obtenen mitjançant l'estimulació d'un únic sistema efector, ens vam plantejar analitzar la validesa general del model establert en el cas de la PLC reexaminant el mecanisme de la seva activació per diferents receptors de set dominis transmembrana, acoblats a proteïnes G, en el teixit cerebral intacte.

És cert que en preparacions de membrana i per a alguns d'aquests receptors s'ha demostrat que l'estimulació de la PLC és dependent de GTP γ S, una evidència clara que el transductor és un component de membrana i que requereix nucleòtids de guanina, és a dir, una proteïna G. També és cert que quan es va purificar la proteïna G_q es va poder estudiar la connexió entre la subunitat α_q unida a GTP i la PLC- β entre diversos receptors i la proteïna G_q, i fins i tot l'acoblament ternari receptor - proteïna G - PLC- β per al cas dels receptors muscarínics de l'acetilcolina, amb experiments de reconstitució. No obstant això, l'engranatge transductor no ha estat establert per a tots els receptors coneguts de set dominis transmembrana que estimulen la PLC i molt poques vegades, per la complexitat que implica, s'ha estudiat en teixit intacte, que és l'únic sistema que pot disposar de la xarxa d'esdeveniments completa perquè tingui lloc la resposta cel·lular que correspon a l'activació d'un receptor; a part, hi ha certes dades que es fan difícils de justificar utilitzant el model d'acoblament mitjançant una proteïna G. D'una banda hi ha evidències que els receptors muscarínics de l'acetilcolina i els α_1 -adrenèrgics activen la PLC amb característiques diferents. Concretament, la resposta dels α_1 -adrenèrgics és molt més sensible que la dels muscarínics al

Ca²⁺ extracel·lular (Minneman i Esbenshade, 1994). Aquests autors han postulat que els subtipus α_{1A} dels receptors adrenèrgics podrien activar la PLC mitjançant un influx de Ca²⁺, mentre que els α_{1B} ho farien a través d'una proteïna G, una hipòtesi que s'avé amb el fet que un augment de Ca²⁺ intracel·lular pot activar la PLC tot i ser-ne una conseqüència. De l'altra banda s'han descrit perfils d'InsPs individuals diferents segons l'agonista que estimula la PLC (Baird i Nahorski, 1990; Challis i Nahorski, 1991). Tot això ens va fer pensar que alguns receptors de set dominis transmembrana, almenys els α_1 -adrenèrgics, al marge de la seva capacitat per interaccionar amb proteïnes G, podrien activar la PLC indirectament, potser de forma secundària a l'entrada de Ca²⁺, contrastant amb l'activació directa mitjançant una proteïna G, exemplificada amb el cas dels receptors muscarínics de l'acetilcolina.

Per a l'estudi que vam realitzar en teixit nerviós intacte (Claro *et al.*, 1993a; Sarri *et al.*, 1995), concretament en miniprismes d'escorça cerebral de rata, estimularem la PLC activant un conjunt de receptors de neurotransmissors, com els colinèrgics muscarínics (M_{1/3}), serotoninèrgics (5-HT₂), adrenèrgics (α_1), histaminèrgics (H₁), glutamatèrgics metabotròpics (mGluR_{1/5}) i de l'endotelina (ET_{A/B}), amb els agonistes Cch, 5-HT, nora-drenalina (NA), histamina (HA), endotelina-1 (ET-1) i àcid *trans*-(1S,3R)-aminociclopentil-1,3-dicarboxílic (*t*-ACPD), respectivament. Tots els receptors amb els quals hem treballat tenen set dominis transmembrana a la seva estructura, interaccionen amb proteïnes G i conformen el grup de receptors amb aquestes característiques que en el cervell activen la PLC d'una forma quantitativa-ment més elevada (Fisher *et al.*, 1992).

El primer enfocament del treball va ser la mesura de diversos intermediaris del cicle dels fosfoinosítids després d'estimular la

PLC amb cadascun dels receptors que hem enumerat. Sospitàvem que l'anàlisi qualitativa dels intermediaris del cicle dels fosfoinosítids podria correlacionar-se amb el mecanisme d'activació de la PLC, ja que si alguns receptors estimulaven la PLC mitjançant un influx de Ca^{2+} previ, aquest hi podria quedar reflectit per haver afectat enzims del metabolisme del DAG i/o de l'Ins1,4,5P₃ sensibles al Ca^{2+} o podria haver estimulat PLC no localitzades a la membrana plasmàtica i per tant capaces d'hidrolit-

zar fosfoinosítids de compartiments metabòlics diferents i potser sotmesos a un reciclatge posterior dels seus productes també diferent. Per a diferents concentracions de cadascun dels sis agonistes, a la figura 9 hem representat l'acumulació de [³H]CDP-DAG (amb el teixit premarcat amb [³H]citidina) a l'eix d'ordenades, i la de [³H]InsPs totals (després de premarcar el teixit amb [³H]inositol) a l'eix d'abscisses. Ambdós paràmetres s'incrementen com a conseqüència de l'activació de la PLC i van ser mesurats en

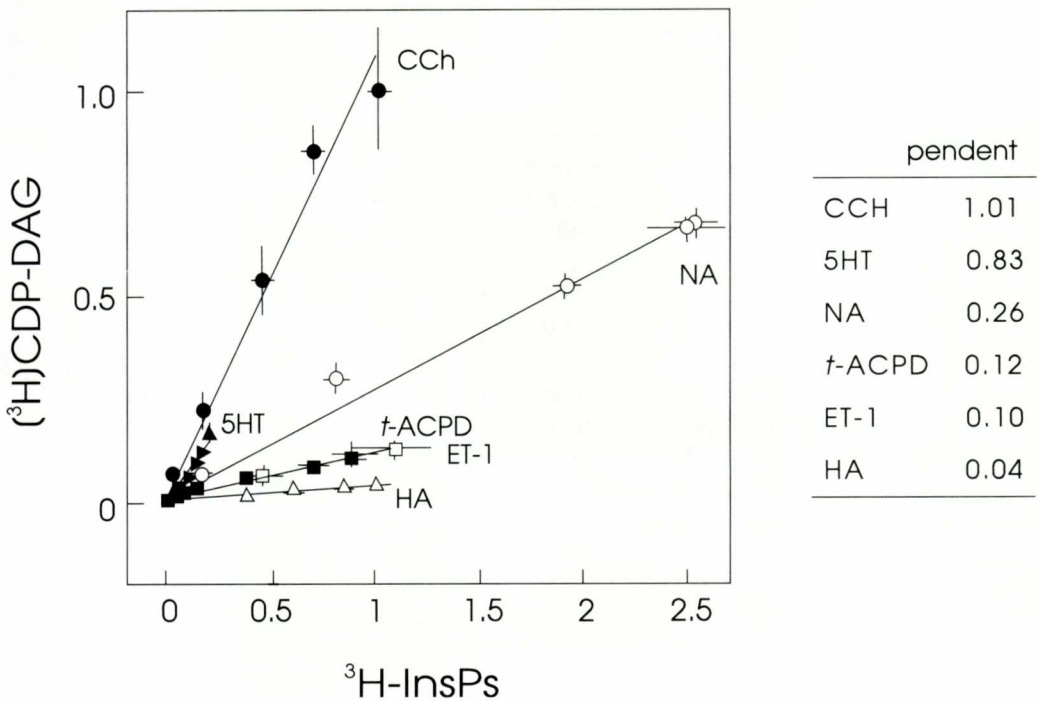


FIGURA 9. Índex d'eficàcies en l'acumulació de [³H]CDP-DAG i de [³H]InsPs per agonistes de receptors de neurotransmissors. Miniprismes d'escorça cerebral de rata foren premarcats amb [³H]citidina o [³H]inositol i estimulats amb concentracions creixents de carbacol (Cch), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), histamina (HA), endotelina-1 (ET-1) o àcid *trans*-(1S,3R)-aminociclopentil-1,3-dicarboxílic (*t*-ACPD). Els punts de cada recta representen les acumulacions de [³H]CDP-DAG (ordenades) i de [³H]InsPs (abscisses) produïdes per les diferents concentracions de l'agonista corresponent. Totes les respostes han estat normalitzades amb referència a l'efecte màxim del Cch (1mM) considerat 1.

un rang de concentracions que va des de la que provoca un efecte basal fins a la que correspon a l'efecte màxim per a cada agonista i en presència de Li^+ , que d'una banda impedeix el reciclatge dels InsPs a inositol, i del'altra provoca un bloqueig en el pas de CDP-DAG a PtdIns per la reducció d'inositol lliure intracel·lular (Figura 3). Totes les respostes van ser normalitzades amb referència a l'efecte màxim del Cch (1 mM), que vam considerar arbitràriament 1. És important observar que el pendent de cada recta, determinat mitjançant regressió lineal i expressat a la dreta de la gràfica (Figura 9) ens permet valorar l'eficàcia de cada agonista per estimular l'acumulació de ^3H CDP-DAG, és a dir, reciclar el DAG per aquesta via cap a PtdIns, en relació amb l'acumulació de ^3H InsPs, independentment de la magnitud global de la resposta. Aleshores, recordant que el pendent pel Cch és arbitràriament 1, sembla clar que si bé el pendent per la 5-HT és força similar al del Cch, els pendents per la NA, la HA, l'ET-1 i el *t*-ACPD ens indiquen que, en comparació amb els dos agonistes anteriors (Cch i 5-HT), presenten un reciclatge del DAG a CDP-DAG més ineficax.

Una altra de les mesures que vam efectuar va ser el perfil de ^3H InsPs individuals, separant-los amb HPLC, després d'estimular-los amb la concentració efectiva màxima de cada agonista durant 30 minuts i en presència de Li^+ . Els perfils obtinguts els hem representat a la figura 10. Només hi ha exposats els pics que corresponen a l'Ins1P (mescla dels enantiòmers Ins1P i Ins3P), a l'Ins4P i a l'Ins1,4P₂, però de fet els altres eren negligibles. Del metabolisme dels InsPs (Figura 3) es desprèn que tant l'Ins1P com l'Ins3P són productes finals, en presència de Li^+ , de la ruta iniciada per la fosforilació de l'Ins1,4,5P₃ mentre que l'Ins4P i l'Ins1,4P₂ són intermediaris de la ruta de desfosforilació de l'Ins1,4,5P₃ o

bé productes de la hidròlisi del PtdIns4P (Figura 5). A primer cop d'ull es pot observar que els perfils són diferents segons el receptor que s'estimuli, sense que sigui una qüestió de magnitud, i per valorar aquesta diferència hem calculat els índexs corresponents a cada perfil indicats a la part superior. Recordant l'origen metabòlic dels diferents InsPs podem entendre que la relació (Ins4P+Ins1,4P₂)/Ins1P ens pot informar o bé sobre el destí metabòlic de l'Ins1,4,5P₃, o bé sobre la sobreproducció dels intermediaris de cada ruta com a conseqüència de la hidròlisi d'altres fosfoinosítids, i el PtdIns4P seria el principal candidat, tal com hem vist anteriorment. El logaritme d'aquesta relació simplement ens converteix una relació més petita o més gran que 1 en un valor negatiu o positiu, respectivament. Com s'indica a la figura 10, per al Cch i la 5-HT l'índex és positiu, mentre que per als altres quatre agonistes és negatiu.

La gràfica de la figura 11 ens resumeix els resultats que fins ara hem exposat perquè, per a cadascun dels agonistes, en ordenades hem representat l'índex del perfil de ^3H InsPs individuals i en abscesses la relació d'eficàcies en l'acumulació de ^3H CDP-DAG i ^3H InsPs totals. A més de ser un resum, aquesta gràfica ens aproxima a una nova dada: les dues característiques analitzades per a cada agonista no sembla que siguin independents ja que es defineixen dos grups de receptors amb respostes de característiques diferents. Quan estimulem la PLC amb Cch o 5-HT, l'acumulació de ^3H CDP-DAG i ^3H InsPs és equilibrada, almenys arbitràriament, i l'Ins1,4,5P₃ pren la ruta començada per la 3-cinasa, mentre que quan els agonistes són la NA, la HA, l'ET-1 o el *t*-ACPD l'acumulació de ^3H CDP-DAG és defectiva en relació amb l'acumulació de ^3H InsPs, i predominen els intermediaris de la via de desfosforilació de l'Ins1,4,5P₃.

Tots aquests resultats poden semblar

abstractes, o si més no especulatiu, però prenen relleu i significat mecànic quan s'analitza l'estimulació de la PLC amb els mateixos agonistes però en una preparació de membranes, també d'escorça cerebral de rata. La gràfica de la figura 12 ens mostra clarament que en aquest sistema, dels sis agonistes utilitzats, només amb el Cch i la 5-HT és possible estimular la PLC per sobre del valor que s'aconsegueix amb el GTP γ S sol. Cal considerar el fet que la capacitat d'un agonista per estimular la PLC en una preparació de membranes implica que els components transductors necessaris estan en el sistema, mentre que la incapacitat significa que n'hi manca algun, i pot tractar-se tant d'un component citoplasmàtic com d'un gradient iònic que existia en la cèl·lula sen-

cera però que s'ha destruït en fer la preparació de membranes. Aleshores, el que d'entrada sembla clar és que els dos grups de receptors definits prèviament basant-nos en les característiques de la seva resposta, activen la PLC mitjançant mecanismes diferents. Si la diferència entre els dos mecanismes és un influx de Ca $^{2+}$ o no, no és una conclusió clara d'aquest treball, i per aportar informació en aquest sentit calia comprovar que les característiques de la resposta que havíem analitzat, almenys per als receptors α_1 -adrenèrgics, com a representants del grup amb característiques de resposta similars en teixit intacte de l'escorça cerebral de rata i incapaços d'estimular la PLC en membranes del mateix teixit, eren sensibles a la concentració de Ca $^{2+}$ extracel·lular.

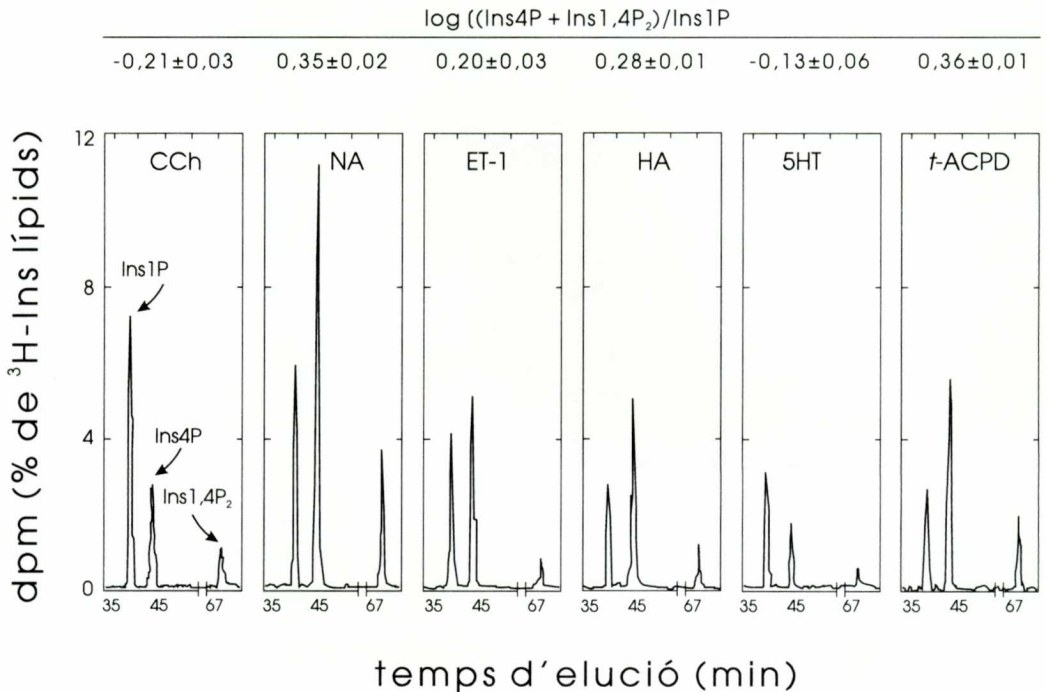
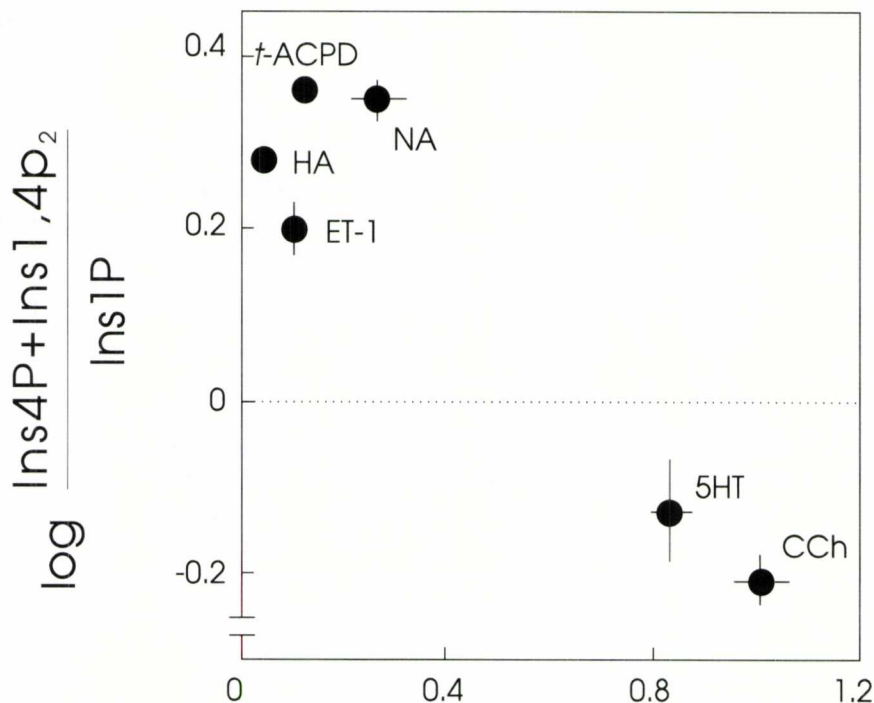


FIGURA 10. Perfils dels [3 H]InsPs acumulats en l'estimulació de la PLC per agonistes de neurotransmissors. Miniprismes d'escorça cerebral de rata premarcats amb [3 H]inositol van ser incubats amb Cch (1mM), 5-HT (0,1mM), NA (3 μ M), HA (1mM), ET-1 (1M) o *t*-ACPD (1mM), i els diferents [3 H]InsPs formats foren separats per HPLC. A la part superior es representa, de forma logarítmica, la relació entre l'acumulació d'Ins1,4P $_2$ + Ins4P i la d'Ins1P per a cada agonista.



relació d'eficàcies CDP-DAG/InsPs

FIGURA 11. Correlació entre els perfils de formació dels diferents InsPs i l'índex CDP-DAG/InsPs per a agonistes de receptors de neurotransmissors. Per a cada agonista es representen els pendents que correlacionen la formació de [³H]CDP-DAG i de [³H]InsPs (Figura 9) i el logaritme de la relació entre l'acumulació d'Ins1,4P₂ + Ins4P i la d'Ins1P (Figura 10).

De fet la relació d'eficàcies en l'acumulació de [³H]CDP-DAG i [³H]InsPs per als receptors α_1 -adrenèrgics, en contraposició als colinèrgics muscarínics, té un valor molt dependent del Ca²⁺ extracel·lular (Claro *et al.*, 1993a). Com més augmenta el Ca²⁺ a fora de la cèl·lula, més inefectiu és el reciclatge del DAG a CDP-DAG. El perfil de [³H]InsPs també varia en funció del Ca²⁺ extracel·lular en el cas dels receptors α_1 -adrenèrgics, però no en el dels muscarínics, i incrementa clarament el valor positiu de l'índex que el representa a mesura que augmenta el Ca²⁺ en les condicions d'assaig (Sarri *et al.*, 1995).

Amb l'estudi que acabem de presentar sobre el mecanisme d'activació de la PLC teníem tres objectius: afegir informació a favor de les hipòtesis que assenyalen la variabilitat i diversificació de sistemes transductors establerts, intentar correlacionar característiques qualitatives de la resposta i mecanismes d'activació, i refermar la hipòtesi que descriu l'activació de la PLC per part dels receptors α_1 -adrenèrgics, juntament amb altres receptors de neurotransmissors amb característiques de resposta similars, mitjançant un influx de Ca²⁺ en l'escorça cerebral de rata.

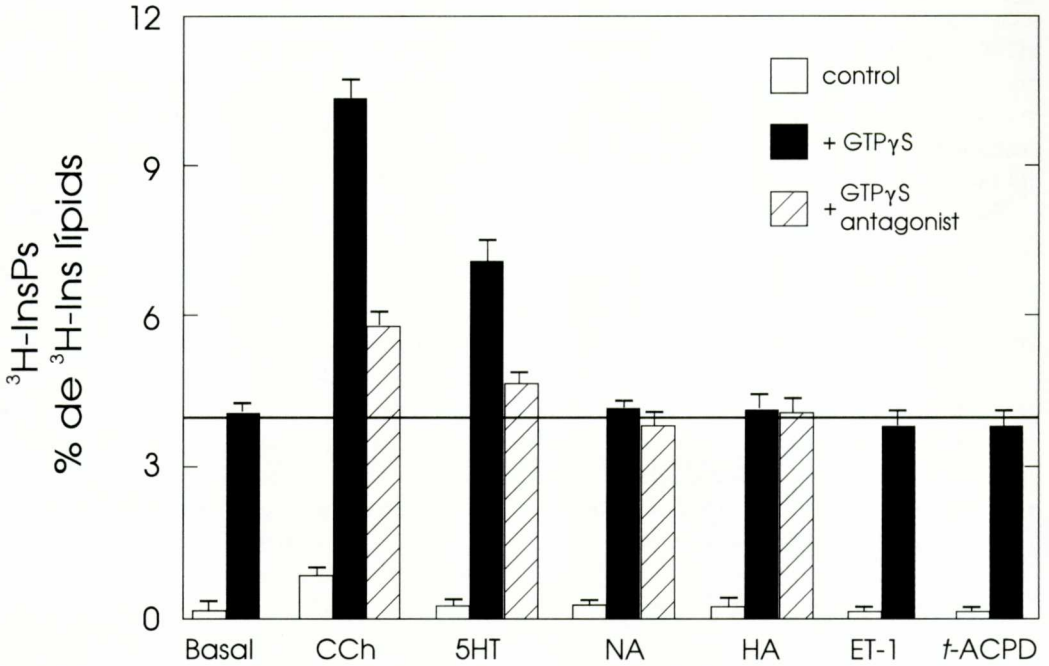


FIGURA 12. Estimulació de la PLC per agonistes en membranes d'escorça cerebral de rat. Membranes premarcades amb [3 H]inositol van ser incubades amb GTP γ S sol o en presència dels agonistes indicats a les concentracions descrites al peu de la figura 10. Els efectes del Cch, 5-HT, NA i HA van ser determinats també en presència dels antagonistes atropina, ketanserina, prazosina i mepiramina, respectivament.

El primer dels objectius que hem mencionat és el que hem aconseguit demostrar més fàcilment, ja que hem vist com no tots els receptors de neurotransmissors amb set dominis transmembrana a la seva estructura i que activen la PLC ho fan amb les mateixes característiques, ja sigui en cèl·lules senceres o en preparacions de membrana.

Hem assenyalat que sembla que hi ha correlació entre les característiques qualitatives de la resposta i el mecanisme d'activació, hem apuntat que sembla existir, però pertany a un terreny més especulatiu l'explicació de per què aquells receptors de neurotransmis-

sors que podrien activar la PLC indirectament mitjançant un influx de Ca^{2+} reciclen el DAG a CDP-DAG ineficaçment, o generen una proporció més elevada dels intermediaris de la ruta de desfosforilació de l'Ins1,4,5P $_3$ sempre en comparació amb aquells que activen la PLC directament a través d'una proteïna G. Nosaltres proposem que una entrada de Ca^{2+} podria activar no tan sols la PLC associada a la membrana plasmàtica sinó també a la citosòlica o de membranes d'òrgans sub-cel·lulars, i això podria implicar que el compartiment metabòlic de fosfoinosítids hidrolitzat fos diferent i estigués sotmès a un

reciclatge dels productes també diferent. Al mateix temps, podria hidrolitzar-se en una proporció més gran el PtdIns4P, afegint Ins1,4P₂ i Ins4P pertanyents a la ruta de desfosforilació en el conjunt d'intermediaris del metabolisme de l'Ins1,4,5P₃.

Finalment, pel que fa a l'activació de la PLC mitjançant un influx de Ca²⁺ per part dels receptors α_1 -adrenèrgics i dels que es comporten de forma similar, el cert és que totes les dades obtingudes reforcen la hipòtesi, però se'ns fa difícil d'afirmar-la amb més rotunditat ja que tot el que tenia d'atràient el sistema utilitzat, perquè s'aproximava a la situació *in vivo*, ens impedeix mesures més directes com la del propi Ca²⁺ intracel·lular i les seves possibles variacions.

Activació de la fosfolipasa D per receptors de neurotransmissors

Per diverses raons ens interessava investigar l'activació de la PLD pels receptors de neurotransmissors amb els quals havíem realitzat el treball sobre el mecanisme d'activació de la PLC i, en el mateix teixit, miniprismes d'escorça cerebral de rata. En primer lloc suposava ampliar la informació sobre els diferents sistemes transductors associats a l'activació d'aquests receptors. Ja se sabia que els receptors α_1 -adrenèrgics i els glutamatèrgics metabotròpics mGluR_{1/5'} però no els colinèrgics muscarínics M_{1/3'} estimulen la PLD en teixit cerebral intacte (Llahí i Fain, 1992; Holler *et al.*, 1994), però la informació en relació amb els receptors serotoninèrgics 5-HT₂, histaminèrgics H₁ i de l'endotelina ET_{A/B'} era o inexistent o només descrita, cas dels ET_{A/B'} en línies tumorals de neurones. En segon lloc volíem aprofundir sobre el que ja s'havia proposat amb referència a l'activació de la PLD com a conseqüència de l'activació de la PLC, amb la participació de la PKC activada, l'augment de Ca²⁺ intracel·lular, o la combinació

d'ambdós fenòmens. Finalment, en tercer lloc, tenint en compte sobretot la sensibilitat de la PLD pel Ca²⁺, vam pensar que l'activació de la PLD podria ser diferent segons els receptors que activen a la PLC ho facin directament o indirectament mitjançant un influx de Ca²⁺, d'alguna manera reflectint el mecanisme d'activació de la PLC.

Primer de tot, doncs, vam estimular els sis receptors amb els mateixos agonistes que havíem utilitzat en estudiar la PLC per mesurar l'activació de la PLD en miniprismes d'escorça cerebral i d'hipocamp de rata. La metodologia més emprada en aquest assaig, aprofita la capacitat de la PLD per catalitzar una reacció de transfosfatidilació que dóna lloc a la formació d'un fosfatidilalcohol si l'assaig s'ha realitzat en presència d'un alcohol primari de cadena curta que actua de nucleòfil en el lloc de l'aigua durant la reacció. Concretament vam premarcar el teixit amb [³²P]Pi i vam utilitzar l'etanol com a acceptor. El producte que s'obté en aquestes condicions, el [³²P]fosfatidiletanol ([³²P]PtdEtOH), no és un fosfolípid natural i, per tant, després de separar-lo de la resta de ³H-fosfolípids mitjançant cromatografia de capa fina en plaques de gel de sílice i comptar-ne la radioactivitat, resulta una mesura inequívoca de l'activitat PLD (Exton, 1990). A la figura 13 hi ha, en forma d'histogrames, els resultats obtinguts en aquest primer assaig. Es veu clarament com només aquells agonistes que estimulen la PLC mitjançant un mecanisme sensible al Ca²⁺ (NA, HA, ET-1 i t-ACPD) estimulen la PLD en el mateix teixit, i, per tant, d'entrada no sembla ser sempre cert que l'activació de la PLD sigui una conseqüència de l'activació de la PLC. Podríem argumentar que en els tipus cel·lulars on s'expressen els receptors colinèrgics muscarínics M_{1/3} o els 5-HT₂ els nivells de PLD són negligibles o que els factors proteics necessaris per a l'acoblament entre el receptor i la PLD no hi són presents. Certament no hem comprovat rigorosament

cap d'aquestes possibilitats, però veient en un assaig posterior que l'activació de la PLD és estrictament dependent del Ca^{2+} extracel·lular, hi hem volgut donar una explicació des d'una altra perspectiva: potser els isoenzims de la PKC que estimulen la PLD, si és aquest el seu mecanisme d'activació, requereixen no tan sols el DAG generat per l'acció de la PLC sinó també, i simultàniament, l'augment de Ca^{2+} que suposaria l'influx inicial d'aquest ió activat pels receptors que estimulen la PLC per un mecanisme sensible al Ca^{2+} . També hi ha la possibilitat que l'increment de Ca^{2+} per ell mateix estimuli la PLD directament, però sobre aquesta afirmació hi ha controvèrsies (Exton, 1994b). Si són o no aquestes les expli-

cacions correctes en relació amb el que hem observat pot ser discutible, però voldríem insistir en el fet que un altre cop les diferències observades respecte a l'acumulació qualitativa dels intermediaris del cicle dels fosfoinosítids, en el grup dels sis receptors estudiats i en l'escorça cerebral, es correlacionen amb mecanismes de transducció diferents i això ens permet proposar aquesta aproximació experimental com una alternativa, accessible i simple, per analitzar la transducció de senyals en talls de teixit o cèl·lules senceres.

En el context d'aquest mateix treball (Sarri *et al.*, 1995b), vam descriure la caracterització dels receptors H_1 de la histamina i ET_B de

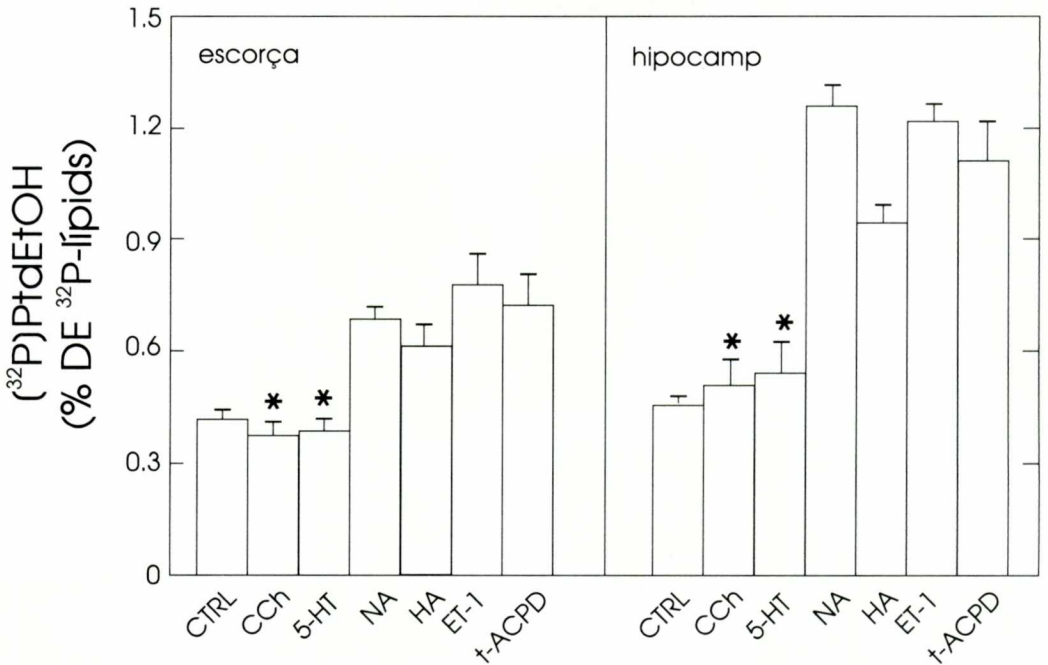


FIGURA 13. Estimulació de la PLD per agonistes de receptors de neurotransmissors en miniprismes d'escorça cerebral i hipocamp de rata. Miniprismes premarcats amb ^{32}P Pi van ser estimulats amb els agonistes indicats a les concentracions descrites al peu de la figura 10 en presència d'etanol. El ^{32}P fosfatidiletanol (^{32}P PtdEtOH) format per l'activitat PLD va ser separat per HPTLC.

l'endotelina com a responsables de l'activació de la PLD en miniprismes d'hipocamp de rata per aquests agonistes.

Especificitat de substrat de la PLD

L'aparició de dues bandes, visualitzades per autoradiografia, a la zona del PtdEtOH de la placa de cromatografia de capa fina, va representar el punt de partida de l'últim treball (Sarri *et al.*, 1996) que comentem. Aquesta observació ens va animar a investigar quins fosfolípids naturals, després de ser metabolitzats per la PLD, donaven lloc a la formació de cadascun dels productes que obteníem. Ens atreia la possibilitat que el PtdIns4P pogués ser substrat de la PLD i així trobar alguna explicació alternativa a la sobreproducció d'Ins4P per part dels agonistes que estimulaven tant la PLD com la PLC de forma dependent del Ca^{2+} extracel·lular, però també consideràvem la possibilitat que la PLD de teixit nerviós hidrolitzés la PtdEtn tal com havia estat descrit en alguns teixits perifèrics.

Ja hem esmentat que mesurar la producció de ^{32}P PtdEtOH és molt útil i específic per estudiar l'activació de la PLD, però com que en aquest assaig el marcatge radioactiu es fa a la fracció lipídica dels fosfolípids, es perd el rastre del cap polar i, per tant, és més difícil d'identificar el substrat que ha trencat la PLD. No obstant això, la primera aproximació experimental va consistir a premarcar el teixit intacte amb ^{32}P Pi i ^3H àcid araquidònic o bé ^3H àcid mirístic, i analitzar la incorporació de cada marcador tant als dos productes, $^3\text{H}, ^{32}\text{P}$ PtdEtOH, obtinguts en condicions basals o estimulats amb noradrenalina o l'ionòfor del Ca^{2+} ionomicina, com a cadascun dels $^3\text{H}, ^{32}\text{P}$ -fosfolípids naturals del teixit, prèviament separats amb cromatografia de capa fina bidimensional. Tenint en compte que el contingut de ^{32}P és una mesura quantitativa, i, per contra, el de ^3H àcid araquidònic o ^3H àcid mirístic és qualitativa, els pri-

mers resultats ens van indicar que dues PtdChos, una rica en ^3H àcid araquidònic i l'altra rica en ^3H àcid mirístic, que es podien separar per cromatografia de capa fina bidimensional, podrien ser els substrats per als dos PtdEtOHs que havíem observat, l'un amb alt contingut de ^3H àcid araquidònic i l'altre, de ^3H àcid mirístic. La segona estratègia experimental ens va ajudar a comprovar que, de fet, els productes que generaven cadascuna de les ^{32}P PtdChos, separades i extretes del gel de sílice prèviament després de ser exposades a una PLD de col en presència d'etanol, eren dos ^{32}P PtdEtOHs diferents però amb la mateixa mobilitat a la placa de capa fina de cadascuna de les bandes que havíem observat a l'inici del treball. Per tant, tot i no poder descartar rotundament la hidròlisi dels altres fosfolípids, a partir dels quals no es genera ^{32}P PtdEtOH si s'exposen a la PLD de col, sembla clar que els substrats principals de la PLD d'hipocamp de rata són dues classes moleculars de PtdCho.

Finalment, i des d'un altre punt de vista, aquest estudi posa un toc d'atenció sobre la utilització, molt extesa a la bibliografia, d'àcids grassos radioactius en el premarcatge dels fosfolípids quan es mesura l'activitat PLD, ja que pot no reflectir la quantitat global de producte format.

BIBLIOGRAFIA

- BAIRD, J. D.; S. R. NAHORSKI (1990). «Differences between muscarinic-receptor and Ca^{2+} -induced inositol polyphosphate isomer accumulation in rat cerebral cortex slices». *Biochem. J.*, núm. 267, pàg. 835-838.
- BATTY, I. H.; S. R. NAHORSKI (1992). «Analysis of ^3H inositol phosphate formation and metabolism in cerebral-cortical slices: Evidence for a dual metabolism of inositol 1,4-bisphosphate». *Biochem. J.*, núm. 288, pàg. 807-815.
- BERRIDGE, M. J. (1993). «Inositol trisphosphate and calcium signalling». *Nature*, núm. 361, pàg. 315-325.
- BERSTEIN, G.; J. L. BLANK; A. V. SMRCKA; T. HIGASHIJIMA; P. C. STERNWEISS; J. H. EXTON; E. M. ROSS (1992). «Re-

- constitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, $G_{q/11}$ and phospholipase C- β 1». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 281-291.
- CHALLIS, R. A.; S. R. NAHORSKI (1990). «Neurotransmitter and depolarization-stimulated accumulation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate mass in rat cerebral cortex slices». *J. Neurochem.*, núm. 54, pàg. 2138-2141.
- CLAPHAM, D. E. (1995). «Calcium signaling». *Cell*, núm. 80, pàg. 259-268.
- CLARO, E.; J. N. FAIN; F. PICATOSTE (1993a). «Noradrenaline stimulation unbalances the phosphoinositide cycle». *J. Neurochem.*, núm. 60, pàg. 2078-2086.
- CLARO, E.; F. PICATOSTE, J. N. FAIN (1993b). «Agonist stimulation of phosphoinositide breakdown in brain membranes» A: Conn, P. M. *Methods in Neuroscience*, vol. 18: *Lipid metabolism in signaling systems*. Orlando: Academic Press, pàg. 38-48.
- CLARO, E.; E. SARRI; F. PICATOSTE (1993c). «Endogenous phosphoinositide precursors of inositol phosphates in rat brain cortical membranes» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 193, pàg. 1061-1067.
- (1995). «Measurement of phospholipase C activity in brain membranes» A: Kendall, D. A. & Hill, S. J. *Methods in Molecular Biology*, vol. 41: *Receptor transduction protocols*. Clifton: Humana Press, pàg. 177-188.
- CLARO, E.; M. A. WALLACE; H. M. LEE; J. N. FAIN (1989). «Carbachol in the presence of guanosine 5'-o-(3-thiotriphosphate) stimulates the breakdown of exogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol». *J. Biol. Chem.*, núm. 264, pàg. 18288-18295.
- EBERHARD, D. A.; R. W. HOLZ (1988). «Intracellular Ca^{2+} activates phospholipase C». *Trends Neurosci.*, núm. 11, pàg. 517-520.
- EXTON, J. H. (1990). «Signaling through phosphatidylcholine breakdown». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 1-4.
- (1994a). «Messenger molecules derived from membrane lipids». *Curr. Op. Cell Biol.*, núm. 6, pàg. 226-229.
- (1994b). «Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1212, pàg. 26-42.
- FISHER, S. K.; A. M. HAECOCK; B. W. AGRANOFF (1992). «Inositol lipids and signal transduction in the nervous system». *J. Neurochem.*, núm. 58, pàg. 18-38.
- FISHER, S. K.; A. M. HAECOCK; E. B. SEGUIN; B. W. AGRANOFF (1990). «Polyphosphoinositides are the major source of inositol phosphates in carbamoylcholine-stimulated SK-N-SH neuroblastoma cells». *Mol. Pharmacol.*, núm. 38, pàg. 54-63.
- HOLLER, T.; E. CAPPEL; J. KLEIN; K. LÖFFELHOLZ (1993). «Glutamate activates phospholipase D in hippocampal slices of newborn and adult rats». *J. Neurochem.*, núm. 61, pàg. 1569-1572.
- JOPE, R. S.; M. B. WILLIAMS (1993). «Lithium and brain signal transduction systems». *Biochem. Pharmacol.*, núm. 47, pàg. 429-441.
- KLEIN, J.; V. CHALIFA; M. LISCOVITCH; K. LÖFFELHOLZ (1995). «Role of phospholipase D activation in nervous system physiology and pathophysiology». *J. Neurochem.*, núm. 65, pàg. 1445-1455.
- LEE, S. B.; S. G. RHEE (1995). «Significance of PIP_2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes». *Curr. Op. Cell Biol.*, núm. 7, pàg. 183-189.
- LLAHÍ, S.; J. N. FAIN (1992). « α_1 -Adrenergic receptor mediated activation of phospholipase D in rat cerebral cortex». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 3679-3685.
- MAJERUS, P. W. (1992). «Inositol phosphate biochemistry». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 61, pàg. 225-250.
- MINNEMAN, K. P.; T. A. ESHENSHADE (1994). « α_1 -Adrenergic receptor subtypes». *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, núm. 34, pàg. 117-133.
- MORRIS, A. J.; J. ENGBRECHT; M. A. FROHAM (1996). «Structure and regulation of phospholipase D». *FEBS Lett.*, núm. 17, pàg. 182-185.
- NEER, E. (1995). «Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals». *Cell*, núm. 80, pàg. 249-257.
- NISHIZUKA, Y. (1995). «Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses». *FASEB J.*, núm. 9, pàg. 484-496.
- STERNWEISS, P. C. (1994). «The active role of β in signal transduction». *Curr. Op. Cell Biol.*, núm. 6, pàg. 198-206.
- SARRI, E.; F. PICATOSTE; E. CLARO (1994). «Neurotransmitter-stimulated breakdown of endogenous polyphosphoinositides in post mortem human brain». *NeuroReport*, núm. 5, pàg. 1059-1062.
- (1995a). «Neurotransmitter-specific profiles of inositol phosphates in rat brain cortex: Relation to the mode of receptor activation of phosphoinositide phospholipase C». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, núm. 272, pàg. 77-84.
- (1995b). «Histamine H_1 and endothelin ET_B receptors mediate phospholipase D stimulation in rat brain hippocampal slices». *J. Neurochem.*, núm. 65, pàg. 95-99.
- SARRI, E.; J. M. SERVITJA; F. PICATOSTE; E. CLARO. (1996). «Two phosphatidylethanol classes separated by thin layer chromatography are produced by phospholipase D in rat brain hippocampal slices». *FEBS Lett.*, núm. 393, pàg. 303-306.