REVISIÓN

Producción de ácido fosfatídico regulada por receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca

Por Fco. J.G. Muriana* y V. Ruiz-Gutiérrez

Instituto de la Grasa (CSIC), Apdo. 1078, 41012-Sevilla. España.

RESUMEN

Producción de ácido fosfatídico regulada por receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca.

En el presente trabajo se efectúa una recopilación de los estudios más recientes e importantes sobre la relación entre los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa intrínseca y el metabolismo lipídico celular, con hincapié en la producción de ácido fosfatídico (PA). Se describen las enzimas fosfolipasa D, que hidroliza la fosfatidilcolina, y diacilglicerol quinasa, que fosforila el diacilglicerol (DG) de distintos orígenes fosfolipídicos, para producir PA. Este PA puede actuar como primer o segundo mensajero, y es una pieza clave en los procesos de transducción de la señal celular, puesto que además sirve para atenuar los niveles de DG, y producir bis-PA, una molécula con actividad fisiológica desconocida, mediante la reacción de transfosfatidilación.

PALABRAS-CLAVE: Ácido fosfatídico — Actividad tirosina quinasa — Diacilglicerol quinasa — Fosfolipasa D — Información (artículo) — Receptor.

SUMMARY

Phosphatidic acid production regulated by receptors with ligand-dependent tyrosine kinase activity.

The present study deals with the most recent and important studies on the relationship between transmembrane receptors with ligand-dependent tyrosine kinase activity and cellular lipid metabolism, predominantly in generating phosphatidic acid (PA) as a lipid messenger. The signaling function of phosphatidylcholine hydrolysis and diacylglycerol (DG) phosphorylation by phospholipase D and diacylglycerol kinase, respectively, as different sources for PA is also described. PA may play a role in signal transduction as a putative first or second messenger, and acts to reduce levels of DG and to produce bis-PA by phospholipase D - mediated transphosphatidylation.

KEY-WORDS: Diacylglycerol kinase — Information (paper) — Phosphatidic acid — Phospholipase D — Receptor — Tyrosine kinase activity.

La Transducción de la señal celular

La capacidad de una célula para responder a una molécula de señalización extracelular determinada depende de la presencia de receptores que se unen específicamente a esa molécula de señalización, también denominada agonista o ligando. La mayoría de estas señales químicas influyen sobre la célula, regulando los procesos fisiológicos de la comunicación intercelular, la proliferación y la diferenciación celular (Devlin, 1992).

La gran mayoría de receptores de superficie celular sufren un cambio de conformación cuando se unen al

agonista. Este cambio conduce a un proceso de autofosforilación y a la generación de una señal intracelular que, en último término, se corresponde con la liberación de segundos mensajeros (Foster, 1993). Estos no sólo permiten que los receptores de superficie transduzcan las señales extracelulares a señales intracelulares, sino que, además, constituyen un mecanismo para amplificar notablemente la señal inicial. Así, los segundos mensajeros actúan como moléculas efectoras alostéricas activando distintas proteínas, como las quinasas, que a su vez convierten a un número muy importante de moléculas sustrato en terceros mensajeros, y así sucesivamente. Una cascada enzimática de este tipo se va multiplicando a medida que progresa, de modo que una sola molécula extracelular de señalización puede generar miles de moléculas efectoras en la célula con la que interacciona (Figura 1).

Figura 1
Esquema simplificado de los procesos relacionados con la transducción de la señal celular

Los receptores de membrana, generalmente constituidos como proteínas poliméricas, se pueden clasificar en tres grupos dependiendo de la estructura de las subunidades (Barnard, 1992). Así, las subunidades de los receptores de la clase 1 son heteroméricas u homoméricas que se disponen alrededor de los poros de la membrana plasmática. Los receptores de la clase 2 se caracterizan por poseer subunidades heteroméricas, homoméricas o heteroméricas post-translacionales, prácticamente empaquetadas por completo en el interior de la membrana plasmática, portando cada subunidad una proteína G. Y los receptores de la clase 3, que se caracterizan por poseer subunidades hasta heterotetraméricas y por mantener una mínima interacción con la membrana plasmática (se sitúan transversalmente a la bicapa lipídica), lo que facilita la movilidad y la comunicación exterior-interior del receptor. El sistema de transducción en este último grupo de receptores puede ser a través de la estimulación o activación de una proteína tirosina quinasa (PTK) intrínseca (Ullrich, 1990).

Los Receptores de Membrana con Actividad Tirosina Quinasa Intrínseca (PTK)

Polipéptidos, tales como los factores de crecimiento, factores de diferenciación o mitogénesis, y hormonas, son muy importantes para la regulación de los sistemas que coordinan el desarrollo de los organismos multicelulares. Muchos de estos factores actúan mediante la interacción con receptores que poseen actividad PTK intrínseca. Estos receptores están constituidos por una porción o dominio extracelular glucosilado, una región transmembrana de naturaleza hidrofóbica, y un dominio citoplasmático que contiene la actividad PTK (Schlessinger, 1988) (Williams, 1989) (Figura 2). Sobre la base de la similitud de secuencia de aminoácidos y las características estructurales, es posible clasificar estos receptores en subclases. Las distintas subclases incluyen dos secuencias repetidas de aminoácidos, predominando cisteína (cys), en el dominio extracelular de los receptores de la subclase I; unas estructuras $\alpha_2\beta_2$ heterotetraméricas unidas por puentes de azufre con secuencias de aminoácidos similares (cys) en los receptores de la subclase II; y cinco o tres porciones repetidas similares a las inmunoglobulinas en los dominios extracelulares de los receptores de las subclases III y IV, respectivamente. El dominio intracelular de PTK en estas últimas subclases se interrumpe por la inserción de secuencias de aminoácidos de naturaleza hidrofílica y de longitud variable (KI) (Figura 2). Ligandos monoméricos, como el factor de crecimiento de la epidermis (EGF), inducen cambios conformacionales en el receptor; mientras que ligandos divalentes, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor estimulante de colonias (CSF-1), inducen la dimerización de los receptores. Esta dimerización hace que aumente la afinidad ligando (agonista)-receptor, se establezcan las interacciones intramoleculares de los receptores, y se facilite la activación de la PTK intrínseca (Ullrich, 1990) (Fantl, 1993).

Numerosos sustratos intracelulares requieren la fosforilación en residuos de tirosina mediante la acción de los

Figura 2
Estructura de dos tipos de receptores con actividad proteína tirosina quinasa intrínseca. Sus dominios transmembrana se encuentran entre los fosfolípidos, proteínas estructurales (incluyendo la proteína helicoidal entre ambos receptores), colesterol libre, ésteres de colesterol,...., de la membrana celular. KI, inserción con secuencia de aminoácidos de naturaleza hidrofílica

receptores tirosina quinasa. Por otra parte, diversos agonistas también estimulan la fosforilación de multitud de sustratos sobre los residuos de serina y treonina, alguno de los cuales son fosforilados por la proteína quinasa C (PKC), o por otras quinasas aún no identificadas (Carpenter, 1992).

El Metabolismo Lipídico y los Receptores con Actividad PTK

La fosforilación de los sustratos celulares, junto con las alteraciones en el contenido iónico de la célula, induce un estímulo interno para el crecimiento. Sin embargo, la cadena de procesos que se inicia por la actividad PTK es todavía poco conocida. Se sabe que este tipo de receptores tiene una influencia muy importante en el metabolismo lipídico, pues, tras ser activados, son capaces de activar a su vez distintas fosfolipasas (como las fosfolipasas A_2 , C y D) (Billah, 1990) (Dennis, 1991) (Figura 3). La fosfolipasa A_2 (PLA_2) hidroliza distintos fosfolípidos (fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) para liberar ácido araquidónico y el respectivo lisofosfolípido (Figura 3). El ácido araquidónico se convierte, vía ciclo-oxigenasa y lipoxigenasa, en productos eicosanoides, como las prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos y lipoxinas. La hidrólisis por la fosfolipasa C (PLC) del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) genera dos segundos mensajeros, el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y el 1,2-diacilglicerol (DG) (Cantley, 1991) (Dennis, 1991) (Jaye, 1992). IP_3 moviliza el Ca^{2+} intracelular, mientras que DG (también con la ayuda de los iones Ca^{2+}) activa algunas de las isoformas de PKC, que fosforila una multitud de moléculas-sustrato y, por lo tanto, controla gran cantidad de procesos celulares (Berridge, 1993). La fosfatidilcolina (PC) también puede ser hidrolizada tanto por la fosfolipasa C (PC-

PLC) como por la fosfolipasa D (PC-PLD), generándose DG y ácido fosfatídico (PA), respectivamente (Figura 3). En condiciones en las cuales hay una hidrólisis simultánea de PIP_2 y PC, la formación de DG vía-receptor es normalmente bifásica, es decir, primero se produce la liberación de DG procedente de PIP_2 (DG_i) de una manera transitoria y poco duradera (durante segundos) que generalmente precede (después de 1-2 minutos) a la liberación de DG procedente de PC (DG_c) de una manera constante y duradera (incluso durante horas) (Billah, 1990) (van Blitterswijk, 1991a) (van der Bend, 1992a). Esta observación se basa en la diferente composición en ácidos grasos de los DGs generados de ambas fuentes (Pessin, 1989). Así, el ácido [^3H]araquidónico se incorpora de manera selectiva en las moléculas de PIP_2 , mientras que los ácidos [^{14}C]palmitico o [^{14}C]mirístico en las de PC. Por lo tanto, es posible determinar el origen de DG (DG_i o DG_c) mediante un doble marcaje isotópico, midiendo simplemente la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ (Martinson, 1989) (van Blitterswijk, 1991a).

Figura 3

Lugares de acción de las distintas fosfolipasas y estructura química de los principales segundos mensajeros que se generan

El control de la hidrólisis fosfolipídica se efectúa mediante PKC, que actúa como un "interruptor": si se activa PKC con un éster de forbol se inhibe la liberación de DG_i pero se estimula PC-PLD; de manera contraria, la regulación por reducción del número de moléculas de PKC mediante un tratamiento prolongado con un éster de forbol induce la liberación de DG_c pero bloquea PC-PLD (van Blitterswijk, 1991a,b).

La Fosfolipasa D y la Transducción de la Señal Celular.

PC-PLD es una enzima que se activa en numerosas células por muchos agonistas, y generalmente en asociación con la hidrólisis de PIP_2 (Billah, 1990) (Billah, 1993). En

ese caso, la activación de PC-PLD parece estar en una posición inferior en la cascada de transmisión (transducción) de la señal celular a la activación de PKC, y se bloquea cuando PKC es regulada por reducción del número de sus moléculas activas (van Blitterswijk, 1991b) (Kester, 1992) (van der Bend, 1992a). Sin embargo, PC-PLD puede activarse de manera independiente de PKC, mediante una(s) proteína(s) G, la cual se cree que actúa directamente sobre PC-PLD (Uings, 1992) (Geny, 1992), y mediante una elevación del Ca^{2+} citosólico (Huang, 1991). Es importante destacar que en membranas de plaquetas y en células HL60 ó NG108-15 permeabilizadas hay un marcado sinergismo entre el efecto del tratamiento con un éster de forbol y $\text{GTP}\gamma\text{S}$ para activar PC-PLD (Geny, 1992) (Liscovitch, 1992) (van der Meulen, 1990). En estas células, parece evidente que la activación completa de PC-PLD requiere la colaboración de PKC, un incremento de Ca^{2+} y una(s) proteína(s) G. Así, dos caminos que se estimulan vía-receptor, uno dependiente y otro independiente de PKC, pueden converger en la activación de PC-PLD. En apoyo de esta hipótesis, estudios recientes en neutrófilos humanos muestran que la activación de PC-PLD por el péptido quimiotáctico fMetLeuPhe es sensible a la toxina pertusis (Bourgoin, 1992a), y que un inhibidor de fosfatasa fosfotirosina, como es el pervanadato, es capaz de estimular PC-PLD (Bourgoin, 1992a,b) (Uings, 1992). Aunque PC-PLD no ha sido purificada o clonada por el momento, si se sabe que su actividad se asocia con la membrana plasmática y el citosol (Wang, 1991). En membranas de células HL60 y neutrófilos, PC-PLD requiere un(os) factor(es) citosólico(s) de naturaleza proteica para expresar su actividad (Anthes, 1991) (Olson, 1991). Células HL60 permeabilizadas pierden gradualmente la actividad PC-PLD que se estimula con $\text{GTP}\gamma\text{S}$, probablemente por la pérdida hacia el espacio extracelular de estos componentes citosólicos (Geny, 1992), los cuales pueden ser la propia enzima PC-PLD citosólica y/o una tirosina quinasa o alguna(s) proteína(s) reguladora(s). Si el proceso de permeabilización se lleva a cabo en la presencia de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ se retiene parcialmente esta actividad, indicando que estos factores pueden acoplarse de una manera dependiente de una proteína G (Cockcroft, 1992).

El Ácido Fosfatídico y la Transducción de la Señal Celular

La hidrólisis de PC mediante la acción de PC-PLD da lugar a la formación de colina y PA (Figura 3). La rápida formación de altas concentraciones de PA durante la estimulación celular vía-receptor sugiere que PA puede desempeñar una función como molécula mediadora en los procesos de transducción celular. Así, en neutrófilos, la cinética de formación de PA a menudo coincide con las cinéticas de actividad respiratoria y secretoria estimuladas con fMetLeuPhe. Si se limita la formación de PA añadiendo etanol a las células, con lo cual se estimula la reacción de transfosfatidilación dando lugar a bis-PA (van Blitterswijk, 1993), entonces se inhiben estas respuestas fisiológicas (Cockcroft, 1992) (Gélas, 1992). Por otra parte, PA es un activador de la enzima PI-4-P quinasa (Moritz, 1992). También PA puede estimular la actividad de pequeñas pro-

teínas G (*ras* y *rho*) mediante la inhibición de sus proteínas activadoras asociadas, GTPasas (Tsai, 1990). PA y lisoPA son inductores potentes de la síntesis de ADN (Moolenaar, 1986) (van Corven, 1989, 1992), aunque este efecto se inicia en la cara externa de la membrana plasmática, posiblemente a través de la estimulación de un receptor específico (van der Bend, 1992b). Por ello, se piensa que es necesario distinguir esta acción exógena de PA de su formación endógena después de una estimulación vía-receptor, puesto que el transporte de PA del exterior al interior celular parece que es muy lento. Así, en contraste a DG, PA no puede simplemente adicionarse al medio de cultivo celular (o generarse en la cara externa de la membrana plasmática) y estudiar su función como segundo mensajero, pues, probablemente, también desempeña una función como primer mensajero o ligando de un receptor específico.

La Diacilglicerol Quinasa y el Control de la Transducción de la Señal Celular

A su vez, la enzima DG quinasa atenúa los niveles intracelulares del segundo mensajero DG, mediante su conversión a PA (Kanoh, 1990) (Figura 4). Por lo tanto, DG quinasa puede indirectamente regular la acción de PKC a través del control celular de los niveles de DG. La purificación de distintas DG quinasa de varios tejidos, y la clonación de los ADN complementarios (cDNAs) de una DG quinasa porcina y otra humana de 86 kD convierten a esta enzima en una de la más importantes en los procesos de transducción celular. Se expresa altamente en timo y moderadamente en cerebro y bazo. En su estructura se incluyen dominios donde se unen el Ca^{2+} ("double EF-hand") y Zn^{2+} ("double cysteine repeat"), así como dos probables dominios conservados donde se une el ATP (Figura 5). Los "double cysteine repeat" de la DG quinasa son altamente homólogos a los de PKC. Estos últimos son capaces de interaccionar con ésteres de forbol y DG (Ono, 1989) (Burns, 1991). Sin embargo, DG quinasa no interacciona con los ésteres de forbol (Schaap, resultados no publicados), por lo que se cree que la función de los "double cysteine repeat" en la secuencia de aminoácidos de DG quinasa es exclusivamente la de unir DG, es decir, la de interaccionar con su sustrato fisiológico. Desde un punto de vista regulatorio, DG quinasa se activa mediante la estimulación de receptores de proteínas G (Rider, 1988) (Lee, 1991) (van Blitterswijk 1991a) (van der Bend et al. 1992a), del complejo receptor T/CD3 en

linfocitos (van der Bend, resultados no publicados), y de receptores con actividad PTK para EGF (Kato, 1985) (Pike, 1987) (Payraastre, 1991), PDGF (McDonald, 1988) o FGF (van Dijk, resultados no publicados). Los ésteres de forbol inducen la translocación de DG quinasa en células Swiss 3T3 y neutrófilos, presumiblemente mediante la activación de PKC. En consecuencia, la actividad DG quinasa se incrementa en la fracción de membrana y disminuye en el citosol (Ishitoya, 1987) (Maroney, 1989). El producto proto-oncogénico pp60^{src} también puede activar a DG quinasa, según estudios realizados en fibroblastos infectados con mutantes sensibles a la temperatura (Sugimoto, 1984). La transformación *ras* de células incrementa generalmente los niveles de DG y activa PKC, lo cual se acompaña con un descenso de DG quinasa unido a membrana (Huang, 1988) (Kato et al. 1988). Estos procesos están probablemente regulados por la fosforilación de la enzima. Así, estudios *in vitro* con DG quinasa porcina de 86 kD muestran que tanto PKC como PKA (proteína quinasa A) son capaces de fosforilar a la enzima. Esta fosforilación no incrementa la actividad de DG quinasa pero sí su estabilidad y su asociación a residuos de fosfatidilserina en la membrana plasmática (Kanoh, 1989). En este sentido, Schaap y colaboradores (1993) demuestran que cuando DG quinasa de 86 kD se sobreexpresa transitoriamente en células COS-7, la enzima se fosforila en residuos de serina tras la estimulación celular con IBMX/forskolina (capaz de activar proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico, cAMP) o con ésteres de forbol (capaces de activar PKC). Estas dos quinasas fosforilan la enzima dentro del mismo fosfopéptido, lo que sugiere que ambas ejercen un control similar sobre DG quinasa. Si se cotransfecta DG quinasa con PKC- α o PKC- ϵ , ambas proteínas quinasas, cuando se estimulan, son capaces de fosforilar DG quinasa *in vivo*. Estos autores también indican que cuando DG quinasa se transfecta en células COS-7, la enzima se fosforila en residuos de tirosina después de la estimulación de los receptores EGF. Puesto que este receptor tiene una actividad PTK intrínseca, DG quinasa puede ser un sustrato directo de los receptores EGF activados. En apoyo de esta hipótesis, el receptor EGF y la proteína DG quinasa co-inmunoprecipitan cuando se sobreexpresan en células COS-7 (Schaap, resultados no publicados). Todos estos datos, considerados de manera colectiva, indican que son múltiples las rutas de señalización que pueden converger en la regulación de la enzima DG quinasa.

Figura 4
Regulación de los niveles intracelulares de diacilglicerol

Figura 5
Diagrama lineal de la enzima diacilglicerol quinasa de 86 kDa

AGRADECIMIENTOS

Nuestro más sincero agradecimiento a los componentes de los distintos equipos de investigación de la División de Bioquímica Celular del Instituto del Cáncer de Holanda (NKI), y en especial a los doctores Wim J. van Blitterswijk, Marc C.M. van Dijk, Dick Schaap, Rob L. van der Bend y Wouter H. Moolenaar (Director de la División), por sus datos aportados a este estudio, apreciable colaboración y amistad.

BIBLIOGRAFIA

- Anthes, J.C., Wang, P., Siegel, M.I., Egan, R.W. y Billah, M.M. (1991).— "Granulocyte phospholipase D is activated by a guanine nucleotide dependent protein factor".— *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 236-243.
- Barnard, E.A. (1992).— "Receptor classes and the transmitter-gated ion channels".— *Trends Biochem. Sci.* **17**, 368-374.
- Berridge, M.J. (1993).— "Inositol triphosphate and calcium signalling".— *Nature* **361**, 315-325.
- Billah, M.M. (1993).— "Phospholipase D and cell signalling".— *Current Op. Immunol.* **5**, 114-123.
- Billah, M.M. y Anthes, J.C. (1990).— "The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis".— *Biochem. J.* **269**, 281-289.
- Bourgoin, S. y Grinstein, S. (1992b).— "Peroxides of vanadate induce activation of phospholipase D in HL60 cells. Role of tyrosine phosphorylation".— *J. Biol. Chem.* **267**, 11908-11916.
- Bourgoin, S., Poubelle, P.E., Liao, N.W., Umezawa, K., Borgeat, P. y Naccache, P.H. (1992a).— "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes phospholipase D activity in human neutrophils in vitro: role of calcium, G-proteins and tyrosine kinases".— *Cell. Signal.* **4**, 487-500.
- Burns, D.J. y Bell, R.M. (1991).— "Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains".— *J. Biol. Chem.* **266**, 18330-18338.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. y Soltoff, S. (1991).— "Oncogenes and signal transduction".— *Cell* **64**, 281-302.
- Carpenter, G. (1992).— "Receptor tyrosine kinase substrates: src homology domains and signal transduction".— *FASEB J.* **6**, 3283-3289.
- Cockcroft, S. (1992).— "G-protein-regulated phospholipase C, D and A₂-mediated signalling in neutrophils".— *Biochim. Biophys. Acta* **1113**, 135-160.
- Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billah, M.M. y Hannun, Y.A. (1991).— "Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction".— *FASEB J.* **5**, 2068-2077.
- Devlin, T.M. (1992).— "Textbook of Biochemistry".— Wiley-Liss Inc., New York.
- Fanti, W.J., Johnson, D.E. y Williams, L.T. (1993).— "Signalling by receptor tyrosine kinases".— *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 453-481.
- Foster, D.A. (1993).— "Intracellular signalling mediated by protein-tyrosine kinases: networking through phospholipid metabolism".— *Cell. Signal.* **5**, 389-399.
- Gélas, P., Von Tschamer, V., Record, M., Baggiolini, M. y Chap, H. (1992).— "Human neutrophil phospholipase D activation by N-formylmethionyl-leucylphenylalanine reveals a two-step process for the control of phosphatidylcholine breakdown and oxidative burst".— *Biochem. J.* **287**, 67-72.
- Geny, B. y Cockcroft, S. (1992).— "Synergistic activation of phospholipase D by protein kinase C- and G-protein-mediated pathways in streptolysin O-permeabilized HL60 cells".— *Biochem. J.* **284**, 531-538.
- Huang, R., Chida, K., Kamata, N., Nose, K., Kato, M., Homma, Y., Takenawa, T. y Kuroki, T. (1988).— "Enhancement of inositol phospholipid metabolism and activation of protein kinase C in ras-transformed rat fibroblasts".— *J. Biol. Chem.* **263**, 17975-17980.
- Huang, R., Kucera, G.L. y Rittenhouse, S.E. (1991).— "Elevated cytosolic Ca²⁺ activates phospholipase D in human platelets".— *J. Biol. Chem.* **266**, 1652-1655.
- Ishitoya, J., Yamakawa, A. y Takenawa, T. (1987).— "Translocation of diacylglycerol kinase in response to chemotactic peptide and phorbol ester in neutrophils".— *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 1025-1030.
- Jaye, M., Schlessinger, J. y Dione, C.A. (1992).— "Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction".— *Biochim. Biophys. Acta* **1135**, 185-199.
- Kanoh, H., Yamada, K. y Sakane, F. (1990).— "Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction?".— *Trends Biochem. Sci.* **15**, 47-50.
- Kanoh, H., Yamada, K., Sakane, F. y Imaizumi, T. (1989).— "Phosphorylation of diacylglycerol kinase in vitro by protein kinase C".— *Biochem. J.* **258**, 455-462.
- Kato, M., Homma, Y., Nagai, Y. y Takenawa, T. (1985).— "Epidermal growth factor stimulates diacylglycerol kinase in isolated plasma membrane vesicles from A431 cells".— *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**, 375-380.
- Kato, M., Kawai, S. y Takenawa, T. (1988).— "Disappearance of diacylglycerol kinase translocation in ras-transformed cells".— *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 959-966.
- Kester, M., Simonson, M.S., McDermott, R.G., Baldi, E. y Dunn, M.J. (1992).— "Endothelin stimulates phosphatidic acid formation in cultured rat mesangial cells: role of a protein kinase C-regulated phospholipase D".— *J. Cell Physiol.* **150**, 578-585.
- Lee, C., Fisher, S.K., Agranoff, B.W. y Hajra, A.K. (1991).— "Quantitative analysis of molecular species of diacylglycerol and phosphatidate formed upon muscarinic receptor activation of human SK-N-SH neuroblastoma cells".— *J. Biol. Chem.* **266**, 22837-22846.
- Liscovitch, M. (1992).— "Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases".— *Trends Biochem. Sci.* **17**, 393-399.
- Maroney, A.C. y Macara, I.G. (1989).— "Phorbol ester-induced translocation of diacylglycerol kinase from cytosol to the membrane in Swiss 3T3 fibroblasts".— *J. Biol. Chem.* **264**, 2537-2544.
- Marinon, E.A., Goldstein, D. y Brown, J.H. (1989).— "Muscarinic receptor activation of phosphatidylcholine hydrolysis".— *J. Biol. Chem.* **264**, 14748-14754.
- McDonald, M.L., Mack, K.F., Richardson, C.N. y Glomset, J.A. (1988).— "Regulation of diacylglycerol kinase reaction in Swiss 3T3 cells".— *J. Biol. Chem.* **263**, 1575-1583.
- Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J. y de Laat, S.W. (1987).— "Growth factor-like action of phosphatidic acid".— *Nature* **323**, 171-173.
- Moritz, A., De Graan, P.N.E., Gispen, W.H. y Wirtz, K.W.A. (1992).— "Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase".— *J. Biol. Chem.* **267**, 7207-7210.
- Olson, S.C., Bowman, E.P. y Lambeth, J.D. (1991).— "Phospholipase D activation in a cell-free system from human neutrophils by phorbol 12-myristate 13-acetate and guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)".— *J. Biol. Chem.* **266**, 17236-17242.
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1989).— "Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence".— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4868-4871.
- Payraastre, B., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Breton, M., den Hartigh, J.C., Plantavid, M., Verkeij, A.J. y Boonstra, J. (1991).— "Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor".— *J. Cell Biol.* **115**, 121-128.
- Pessin, M.S. y Raben, D.M. (1989).— "Molecular species analysis of 1,2-diglycerides stimulated by α -thrombin in cultured fibroblasts".— *J. Biol. Chem.* **264**, 8729-8738.
- Pike, L.J. y Eakes, A.T. (1987).— "Epidermal growth factor stimulates the production of phosphatidylinositol monophosphate and the breakdown of polyphosphoinositides in A431 cells".— *J. Biol. Chem.* **262**, 1644-1651.
- Rider, M.H. y Baquet, A. (1988).— "Activation of rat liver plasma-membrane diacylglycerol kinase by vasopressin and phenylephrine".— *Biochem. J.* **255**, 923-928.
- Schlessinger, J. (1988).— "Signal transduction by allosteric receptor oligomerization".— *Trends Biochem. Sci.* **13**, 443-447.
- Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L.C. y Erikson, R.L. (1984).— "Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol".— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2117-2121.
- Tsai, M.H., Yu, C.L. y Stacey, D.W. (1990).— "A cytoplasmic protein inhibits the GTPase activity of H-ras in a phospholipid-dependent manner".— *Science* **250**, 982-985.
- Uings, I.J., Thompson, N.T., Randall, R.W., Spacey, G.D., Bonser, R.W., Hudson, A.T. y Garland, L.G. (1992).— "Tyrosine phosphorylation is involved in receptor coupling to phospholipase D but not phospholipase C in the human neutrophil".— *Biochem. J.* **281**, 597-600.

- Ullrich, A. y Schlessinger, J. (1990).– "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity".– *Cell* **61**, 203-212.
- Van Corven, E., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. y Moolenaar, W.H. (1989).– "Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signalling pathways mediated by G proteins".– *Cell* **59**, 45-54.
- Van Corven, E., van Rijswijk, A., Jalink, K., van der Bend, R., van Blitterswijk, W.J. y Moolenaar, W. H. (1992).– "Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts".– *Biochem. J.* **281**, 163-169.
- Van Blitterswijk, W.J., Hilkmann, H., de Widt, J. y van der Bend, R.L. (1991a).– "Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblasts. I. Biphasic formation of diacylglycerol from phosphatidylinositol and phosphatidylcholine, controlled by protein kinase C".– *J. Biol. Chem.* **266**, 10337-10343.
- Van Blitterswijk, W.J., Hilkmann, H., de Widt, J. y van der Bend, R.L. (1991b).– "Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblasts. II. Phosphatidylcholine breakdown by phospholipases C and D; involvement of protein kinase C".– *J. Biol. Chem.* **266**, 10344-10350.
- Van Blitterswijk, W.J. and Hilkmann, H. (1993).– "Rapid attenuation of diacylglycerol and phosphatidic acid second messengers by phospholipase D-mediated formation of bisphosphatidic acid".– *EMBO J.* **12**, 2655-2662.
- Van der Bend, R.L., de Widt, J., van Corven, E.J., Moolenaar, W.H. y van Blitterswijk, W.J. (1992a).– "The biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, induces phosphatidylcholine breakdown in fibroblasts via activation of phospholipase D. Comparison with the response to endothelin".– *Biochem. J.* **285**, 235-240.
- Van der Bend, R.L., Brunner, J., Jalink, K., van Corven, E., Moolenaar, W.H. y van Blitterswijk, W.J. (1992b).– "Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid".– *EMBO J.* **11**, 2495-2501.
- Van der Meulen, J. y Haslam, R.J. (1990).– "Phorbol ester treatment of intact rabbit platelets greatly enhances both the basal and guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate-stimulated phospholipase D activities of isolated platelet membranes".– *Biochem. J.* **271**, 693-700.
- Wang, P., Anthes, J.C., Siegel, M.I., Egan, R.W. y Billah, M.M. (1991).– "Existence of cytosolic phospholipase D".– *J. Biol. Chem.* **266**, 14877-14880.
- Williams, L.T. (1989).– "Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor".– *Science* **243**, 1564-1570.

Recibido: Junio 1994

Aceptado: Enero 1995