



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

**ÁCIDOS GRASOS LIBRES Y ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA CINASA C
INDUCE LA FOSFORILACIÓN DEL GPR120 (RECEPTOR DE ÁCIDOS GRASOS
LIBRES 4)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
OMAR BENONI SÁNCHEZ REYES

JÉSUM ADOLFO GARCÍA SAÍNZ
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MARINA GAVILANES RUIZ
Facultad de Química, UNAM
MARINA MACÍAS SILVA
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MÉXICO, D. F. Mayo 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el financiamiento por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN212609) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (153278).

Omar Benoni Sánchez Reyes fue alumno del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y fue apoyado con becas del posgrado del CONACyT.

Dedicatoria

A mi madre por todo su esfuerzo, por ser un ejemplo a seguir y por enseñarme que con trabajo puedo lograr todos mis sueños.

A mi hermano por ser un ejemplo de vocación y por siempre verme con ojos de hermano mayor.

A mi hermana por enseñarme que un espíritu aventurero logra muchas cosas fuera de lo ordinario.

A mi padre por apoyarme a estas alturas de mi vida.

A mi tía María Luisa por ser una segunda madre para mí.

A Sofía por ser el complemento perfecto en esta etapa de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Al Dr. García Sáinz por permitirme ser parte de su prestigioso laboratorio, por su apoyo incondicional hacia mi crecimiento profesional, por todas sus lecciones, por su entusiasmo incansable hacia mis proyectos bien fundamentados y por su dirección eficaz en proyectos no tan bien sustentados.

A mi comité tutorial:

Agradezco a la Dra. Marina Macias Silva, por sus consejos y apoyo en el desarrollo del proyecto así como por su compromiso con el posgrado, la universidad y la ciencia, por ser inspiración de varias generaciones.

Agradezco a la Dra. Marina Gavilanes Ruiz, por creer en mi y en mis propuestas, por todo su apoyo y consejos.

A mi jurado de examen doctoral:

A la Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares, a la Dra. Claudia Gonzalez Espinosa, al Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz, al Dr. Ignacio Camacho Arroyo y a la Dra. Clorinda Arias Alvarez por sus valiosos comentarios para la mejora de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por ponerle un toque divertido a la transducción de señales. A Aurelio por ser un apoyo cuando llegue en mi servicio social, por hacerme sentir como en casa cuando regrese y ayudarme a avanzar rápido compartiendo su experiencia. A Jean por ser guía y motor para hacer cosas nuevas y hacer graciosos mis intentos fallidos para tolerar la frustración. A Alfonso, Silvana, Carla y German por su amistad y por compartir tantos momentos alegres y bromas que solo los que se dedican a señalización entienden.

A los miembros del Laboratorio:

A Tere por hacerme sentir como en casa, por su amistad, por su completa disposición para que yo tuviera todo lo necesario para realizar mis proyectos y por todo su apoyo técnico y consejo cuando las cosas no me salían bien.

A Rocío por su amistad, por los buenos consejos en los experimentos y por su apoyo moral en tiempos de frustración.

A Lupita y Fermín por su disposición a ayudarme en todo lo que necesitaba.

Reconocimientos

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis, integrado por:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz.

Dra. Marina Gavilanes Ruiz.

Dra. Marina Macías Silva.

El jurado del examen doctoral estuvo constituido por:

Presidente: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares.

Vocal: Dra. Claudia Gonzalez Espinosa.

Vocal: Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz.

Vocal: Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Secretario: Dra. Clorinda Arias Alvarez.

Agradezco la asesoría técnica de la Dra. María Teresa Romero Ávila y de la Dra. Roció Alcántara Hernández.

Agradezco al personal de las unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular.

Unidad de Microscopia (Imagenología).

Dr. Fernando García Hernández.

Biol. Gabriel Orozco Hoyuela.

Unidad de Biología Molecular.

Dra. Laura Ongay Larios.

Biol. María Guadalupe Códiz Huerta.

Biol. Dolores Minerva Mora Cabrera.

Unidad de Computo.

Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo.

Ing. Ivette Rosas Arciniega.

Indice

1. Tabla de abreviaturas	3
2. Resumen	6
3. Introducción	7
3.1. Metabolismo de los ácidos grasos omega 3	8
3.2. Receptores de siete dominios transmembranales	9
3.3. Receptores acoplados a proteínas G activados por ácidos grasos libres	14
3.4. Proteína cinasa C como regulador de la función de GPCRs.	23
4. Planteamiento del problema	32
5. Hipótesis	33
6. Objetivos	34
7. Métodos	35
7.1. Líneas Celulares	35
7.2. Construcción de proteínas de recombinantes	35
7.3. Medición de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)	37
7.4. Fosforilación del receptor FFA4 (GPR120)	40
7.5. Microscopía y análisis de imágenes	41
7.6. Análisis estadístico	42
8. Resultados	43
9. Discusión	57
10. Conclusion	60
11. Referencias	61

1. Tabla de abreviaturas

7TMRs	Receptores de siete dominios transmembranales
AGC	Familia de proteína cinasas A,G y C
aPKC	Isoformas atípicas de PKC
BIM I	Bis-indoil-maleimida
Ca	Ion calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CCK	Colecistocinina
CCL-2	Ligando de quimiocina 2 de dominio C-C
CMV	Citomegalovirus
cPKC	Isoformas clásicas de PKC
db/db	Homocigoto para una mutación puntual del receptor de leptina
DHA	Ácido docosahexaenoico
DTT	Ditiotreitol
EC	Concentración efectiva 50
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FFA1, GPR40	Receptor de ácidos grasos libres 1, receptor acoplado a proteínas G 40
FFA2, GPR43	Receptor de ácidos grasos libres 2, receptor acoplado a proteínas G 43
FFA3, GPR41	Receptor de ácidos grasos libres 3, receptor acoplado a proteínas G 41
FFA4, GPR120	Receptor de ácidos grasos libres 4, receptor acoplado a proteínas G 120
FFAs	Ácidos grasos libres
FLP	Recombinasa (Flippase)
FRT	Sitio de reconocimiento de la recombinasa
Fura2-AM	Fura2-acetometoxi
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GIP	Peptido inhibidor gastrico
GLP-1	Peptido parecido a glucagon 1

GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPR119	Receptor acoplado a proteínas G 119
GPR120L	Variante larga del receptor acoplado a proteínas G 120
GPR120S	Variante corta del receptor acoplado a proteínas G 120
Gpr40+/lacZ	Receptor acoplado a proteínas G 40 fusionado con β -galactosidasa
GRKs	Cinasas de receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HEK293	Células de riñón de embrión humano 293
HR1	Dominio N-terminal antiparalelo de hélice superenrollada
ICL3	Asa intracelular 3
IgGs	Inmunoglobulinas G
I κ B	Inhibidor de NF κ B
JNK	Cinasa de la región amino terminal del producto del gen c-jun
KinL	Lobulo cinasa inferior
KinU	Lobulo cinasa superior
KO-GPR120	Knock-out del gen GPR120
lacZ	Gen de β -galactosidasa
LPS	Lipopolisacárido
MCF-7	Células de cancer de mama 7 de Michigan Cancer Foundation
MECA	Melacortina, Endotelial, Canabinoide y Adenosina
MKK4	Proteína cinasa cinasa activada por mitógenos 4
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mTORC2	Complejo blanco de rapamicina de mamíferos 2
NC-IUPHAR	Comité de Nomenclatura de Receptores y Clasificación de Fármacos de la Union Internacional de Farmacología Básica y Clínica
NF- κ B	Factor nuclear de cadena ligera kappa estimulador de células B activadas
NIH	Institutos Nacionales de Salud de E.U.A.
nPKC	Isoformas nuevas de PKC

PB1	Dominio Phox y Bem1p
PKD1	Cinasa dependiente de fosfoinositidos 1
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
PKN	Proteína cinasa N
PMA	Éster de forbol miristato acetato
PPAR	Receptor activado proliferador de peroxisomas
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SREBP	Proteína de unión del elemento regulador de esteroides
SV40	Virus 40 vacuolado de simio
TAB1	Proteína de unión a TAK1
TAK1	Cinasa 1 activada por factor de crecimiento transforman β
TetO2	Operador 2 del represor tet
TIRF	Fluorescencia de reflexión interna total
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNF α	Factor de necrosis tumoral 4
TO	Operador de tetraciclina
YFP	Proteína amarilla fluorescente
Zeo	Zeocina
α -LA	Ácido alfa-linolénico
β -ARK	Cinasa del receptor β -adrenergico
Ω 3	Omega 3

2. Resumen

El GPR120 o FFA4 es un receptor al cual recientemente se le caracterizaron sus agonistas endógenos. Este receptor acoplado a proteínas G parece tener papeles cardinales en la regulación del metabolismo y en la patofisiología de desordenes inflamatorios y metabólicos. En el presente trabajo una proteína de fusión GPR120-Venus se expresó en células HEK293 Flp-In T-REx y se estudió su función (incremento de calcio intracelular) y fosforilación. Observamos que la proteína de fusión migraba en geles SDS-PAGE como una banda de aproximadamente 70-75 kDa; sin embargo se detectaron otras bandas de mayor peso aparente (mas de 130 kDa). La estimulación con DHA o α -LA indujo un incremento dosis dependiente de calcio intracelular y fosforilación del GPR120. La activación de la PKC con ésteres de forbol también indujo una marcada fosforilación del receptor, pero no alteró la habilidad de DHA 1 μ M de incrementar la concentración de calcio intracelular. La fosforilación inducida por PMA, pero no la inducida por DHA, se bloqueó por inhibidores de PKC (bis-indoil-maleimida I y Gö 6976) sugiriendo que las isoformas convencionales son responsables de esta acción. La ausencia del efecto de los inhibidores de PKC en la fosforilación inducida por agonistas indica que esta cinasa no tiene un papel importante en está fosforilación. La acción del DHA estuvo asociada con una marcada internalización del GPR120 mientras que la internalización inducida por PMA fue menor a tiempos tempranos.

3. Introducción

La composición de ácidos grasos libres (FFAs; siglas en inglés) en un individuo está sujeta a muchas variables, incluyendo la expresión y la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo. Las vías por las cuales un organismo obtiene FFAs son muy diversas pero en términos generales se pueden dividir en dos, la vía intrínseca y la vía extrínseca. La síntesis *de novo* o vía intrínseca se lleva a cabo a partir de glucosa en tejidos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo. La vía extrínseca es la ingesta y la absorción intestinal de FFAs.

En organismos pluricelulares se requiere una regulación cuidadosa entre las vías intrínseca y extrínseca para establecer una sinergia celular que genere una homeostasis energética. Se ha observado que el fallo en la regulación del metabolismo de FFAs es un factor responsable de la resistencia a insulina y la aparición de Diabetes Mellitus tipo 2. La presencia de algunos FFAs es esencial para la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células β pancreáticas. Sin embargo, si los FFAs están en exceso crónicamente, pueden reducir la biosíntesis y secreción de insulina e inducir apoptosis de las células β (1).

Los efectos de los FFA ocurren por su participación como sustratos en vías de señalización intracelular, al activar factores de transcripción sensibles a metabolitos como los PPAR (receptor activado proliferador de peroxisomas), SREBP (proteína de unión del elemento regulador de esteroides) y elementos de respuesta de FFAs (2, 3). También se ha visto que los FFAs pueden señalar a través de receptores de siete dominios

transmembranales (7TMRs) localizados en la membrana celular. Recientemente, a esta señalización de los FFAs se le ha puesto mucho interés porque se piensa que es uno de los mecanismos responsables de lograr el balance entre los dos componentes del metabolismo de ácidos grasos (4).

3.1. Metabolismo de los ácidos grasos omega 3

El uso del término omega 3 ($\Omega 3$ o n-3) en la nomenclatura de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; siglas en inglés) indica la posición del doble enlace que está más cerca del último metilo de la cadena alifática. Como otros ácidos grasos los PUFA tienen nombres sistemáticos y nombres comunes. Frecuentemente se les refiere con una nomenclatura sencilla que indica el número de carbonos de la cadena alifática, el número de dobles enlaces y la posición del primer doble enlace en relación con el último metilo de la cadena. El ácido graso $\Omega 3$ más simple es el ácido α -linolénico (18:3 $\Omega 3$). Se sintetiza por desaturación del ácido linoleico (18:2 $\Omega 6$) en una reacción catalizada por la $\Delta 15$ desaturasa (Figura 1). Las plantas poseen la enzima $\Delta 15$ desaturasa por lo que son capaces de sintetizar ácido α -linolénico, mientras que los animales no. Por tal motivo, los animales obtienen ácido α -linolénico por medio de la dieta. Una vez que los animales obtienen ácido α -linolénico son capaces de metabolizarlo a través de elongaciones y desaturaciones. Como se muestra en la Figura 1, el ácido α -linolénico es convertido por la $\Delta 6$ desaturasa en ácido estearidónico (18:4 $\Omega 3$), que es convertido por la elongasa en ácido eicosatetraenoico

(20:4 Ω 3); este a su vez es desaturado por la Δ 5 desaturasa para obtener el ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:4 Ω 3). Finalmente el EPA mediante una serie de elongaciones y desaturaciones es metabolizado hasta ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6 Ω 3).

Se puede ver en la Figura 1 que la conversión del ácido α -linolénico a EPA y ácido docosahexaenoico (DHA) compite con la conversión del ácido linoleico a ácido araquidónico (20:4 Ω 6) porque las dos vías utilizan las mismas enzimas. La enzima Δ 6 desaturasa es el paso limitante de estas dos rutas metabólicas; esta enzima prefiere como sustrato al ácido α -linolénico. En las dietas occidentales el ácido linoleico es consumido de 5 a 20 veces más en comparación al ácido α -linolénico, es por esto que el metabolismo de los ácidos Ω 6 (ácidos linoleico y araquidónico) es cuantitativamente más importante. La síntesis de DHA y EPA en humanos es limitada, no obstante, el pescado contiene cantidades significativas de estos PUFAs. Una ración completa de salmón puede contener de 1.5 a 3 g de ácidos grasos omega 3 (5, 6).

3.2. Receptores de siete dominios transmembranales

La información adquirida una vez terminado el proyecto del genoma humano permitió la identificación de una familia grande de proteínas con una región en común. La región esta compuesta por siete grupos de 20-24 aminoácidos hidrofóbicos dispuestos en α -hélices. A estas proteínas que resultaron ser receptores de muchas hormonas conocidas se les denominó receptores de 7 dominios transmembranales (7TMRs). Se han identificado

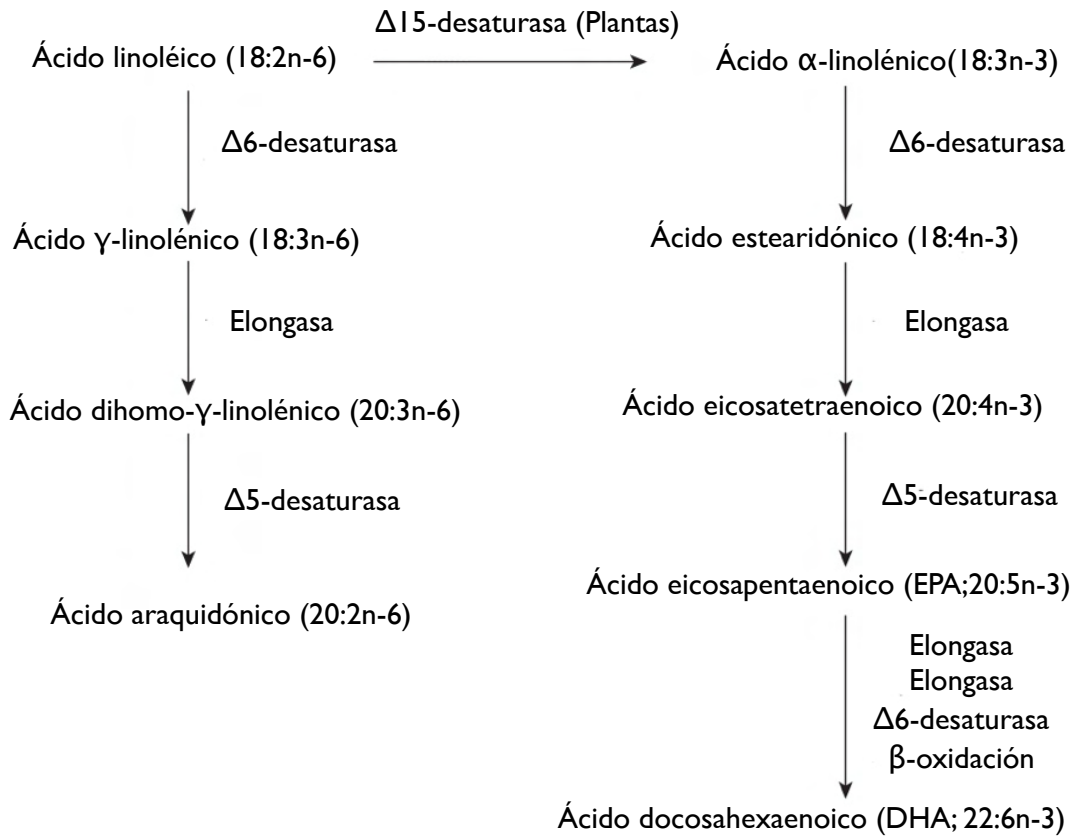


Figura 1. Metabolismo de ácidos grasos Ω_6 (ácido linoléico) y Ω_3 (ácido α -linoléico) a ácidos grasos más poliinsaturados, el DHA y el EPA. Imagen modificada de Calder 2012 (6).

aproximadamente 800 de estos 7TMRs. La subdivisión de éstos, de acuerdo a la similitud de su secuencia, permite la definición de las familias de receptores de rodopsina, secretina, adhesión, glutamato y frizzled. La NC-IUPHAR reconoce a las clases A, B y C las cuales son las familias de rodopsina, secretina y glutamato respectivamente (7).

Los receptores se denominan así porque la célula los utiliza para detectar de manera muy selectiva fotones, iones o moléculas que se encuentran en el ambiente extracelular. La detección de la señal extracelular provoca que la célula modifique su comportamiento. Los receptores son parte del sistema de transducción que convierte las señales extracelulares en

señales intracelulares. La señalización intracelular de los 7TMRs generada por compuestos selectivos (agonistas) es compleja, sin embargo, sigue ciertos principios básicos. El primero es la interacción inicial del receptor con la proteína G heterotrimérica. Los 7TMRs también se denominan receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) porque la mayoría de ellos interaccionan con proteínas G heterotriméricas. Una vez que el receptor adopta una conformación activa, resultado de la unión con su agonista, los dominios intracelulares del GPCR se acoplan con la proteína G heterotrimérica ($G\alpha\beta\gamma$) que se encuentra anclada a la membrana. La proteína G esta asociada a GDP de forma basal. Después de esta interacción la proteína G cambia su GDP asociado por GTP, lo que genera la disociación de la subunidad $G\alpha$ de las subunidades $G\beta\gamma$. Las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ interaccionan con efectores intracelulares río abajo de la cascada de señalización (8). La activación de múltiples complejos y el reciclamiento de la subunidad $G\alpha$ de su forma activa a su forma inactiva le dan una amplificación y una regulación temporal, respectivamente, a la señal generada por la activación del receptor (9).

Después de un tiempo dado, el receptor es desensibilizado. Esta desensibilización o reducción de la señal se da por el bloqueo de la conformación activa del receptor. El bloqueo se debe a la disociación del agonista y/o a la unión de receptor con β -arrestinas. La interacción β -arrestinas se genera porque el receptor después de activarse es fosforilado por cinasas. Esta interacción puede llevar o no a la internalización del receptor, es decir, que no se encuentre disponible en la membrana plasmática sino que se encuentre endocitado (10).

Existen en el humano por lo menos 16 subunidades $G\alpha$, 5 subunidades $G\beta$ y 11 subunidades $G\gamma$. Las respuestas de los sistemas efectoros de las subunidades $G\alpha$ pueden agruparse en cuatro actividades principales, estos fenómenos están controlados por la clase de subunidad $G\alpha$ que es activada: 1) estimulación de la producción de cAMP (subunidad $G\alpha_s$), 2) inhibición de la producción de cAMP (subunidad $G\alpha_i$), 3) estimulación de la fosfolipasa C, con la subsecuente movilización de Ca^{2+} del retículo endoplasmático al citosol (subunidad $G\alpha_q$) o 4) modificación de la regulación del citoesqueleto generando cambios en la forma y/o en la migración celular (subunidad $G\alpha_{12/13}$). Cada receptor se acopla a las subunidades $G\alpha$ de forma específica. Además de los efectos controlados por las subunidades $G\alpha$, las subunidades $G\beta\gamma$ también pueden regular efectoros los cuales incluyen formas adicionales de la adenilil ciclasa y canales iónicos (11).

En la Figura 2 se muestran los componentes moleculares de las vías de señalización por GPCRs y como estos componentes interaccionan para generar múltiples efectos y tipos de regulación. Los agonistas que activan a cada uno de los GPCRs definidos por la información de los genomas no se conocen en su totalidad. Aproximadamente 750 GPCRs en el genoma humano pueden ser blancos farmacológicos. La naturaleza de los sitios de unión de los agonistas con su receptor es muy variada e incluye sitios de activación conservados y sitios alostéricos remotos que regulan la afinidad de los sitios de activación. La dimerización y oligomerización de GPCRs del mismo tipo (homo) o de diferentes tipos (hetero) da una mayor especificidad y complejidad a sus respuestas farmacológicas. El receptor activado puede interaccionar con uno o varios tipos de proteínas G. Los efectos

celulares pueden ocurrir parcialmente o totalmente, pueden ser positivos o negativos y pueden ser afectados positiva o negativamente por moduladores alostéricos. Esta cantidad de permutaciones posibles nos ayuda a comprender la creciente complejidad de la farmacología que exhibe esta superfamilia de receptores (12, 13).

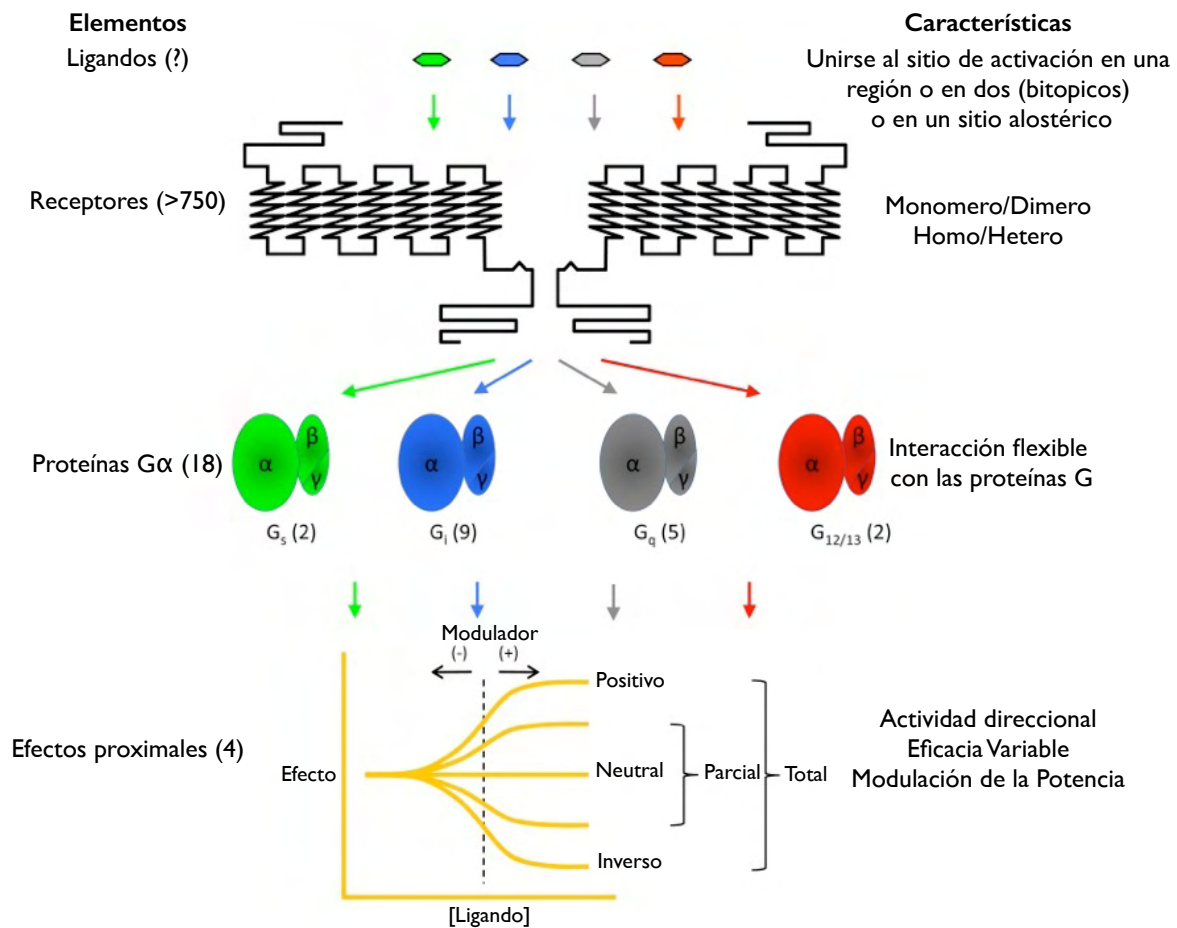


Figura 2. Componentes y acciones de la señalización por GPCRs. Imagen modificada de Salon et al. 2011(12).

3.3. Receptores acoplados a proteínas G activados por ácidos grasos libres

Dentro de la familia de rodopsina de GPCRs está el grupo del receptor de ácidos grasos libres 1 (FFA1). Este grupo incluye al mismo FFA1 (previamente GPR40), el FFA2 (previamente GPR43) y el FFA3 (previamente GPR41). Recientemente, los receptores GPR119 y GPR120 se identificaron como receptores de aminas de FFAs y FFAs de cadena mediana y larga respectivamente (14, 15).

Todos los receptores del grupo de FFA1 están localizados en tándem en el cromosoma 19q13.1. De acuerdo con la similitud de sus secuencias el FFA1, FFA2 y FFA3 forman un grupo bien definido que pertenece a la subfamilia de GPCRs de nucleótidos y lípidos. El FFA1 es el único receptor del grupo que es selectivo para ácidos grasos de cadena mediana y larga, mientras que el FFA2 y FFA3 son activados por ácidos grasos de cadena corta. El receptor de ácidos grasos de cadena mediana a larga FFA4 (previamente GPR120) no pertenece al grupo de FFA1, sino que pertenece a otra subfamilia que incluye varios receptores huérfanos y un grupo de receptores de melatonina. A pesar de que los receptores FFA1 y FFA4 se activan por ácidos grasos de cadena larga, estos dos receptores sólo exhiben un 19% de similitud en su secuencia. Los modelos propuestos por Constanzi *et al.* (16) indican que los receptores no comparten determinantes de reconocimiento de ligando; es decir, ninguno de los residuos del receptor FFA1 propuestos para ser sitios de unión a ligando está conservado en el FFA4. Además, el FFA4 no tiene residuos básicos en

la cavidad transmembranal, que son característicos de la subfamilia de receptores de nucleótidos y lípidos (17) (Figura 3).

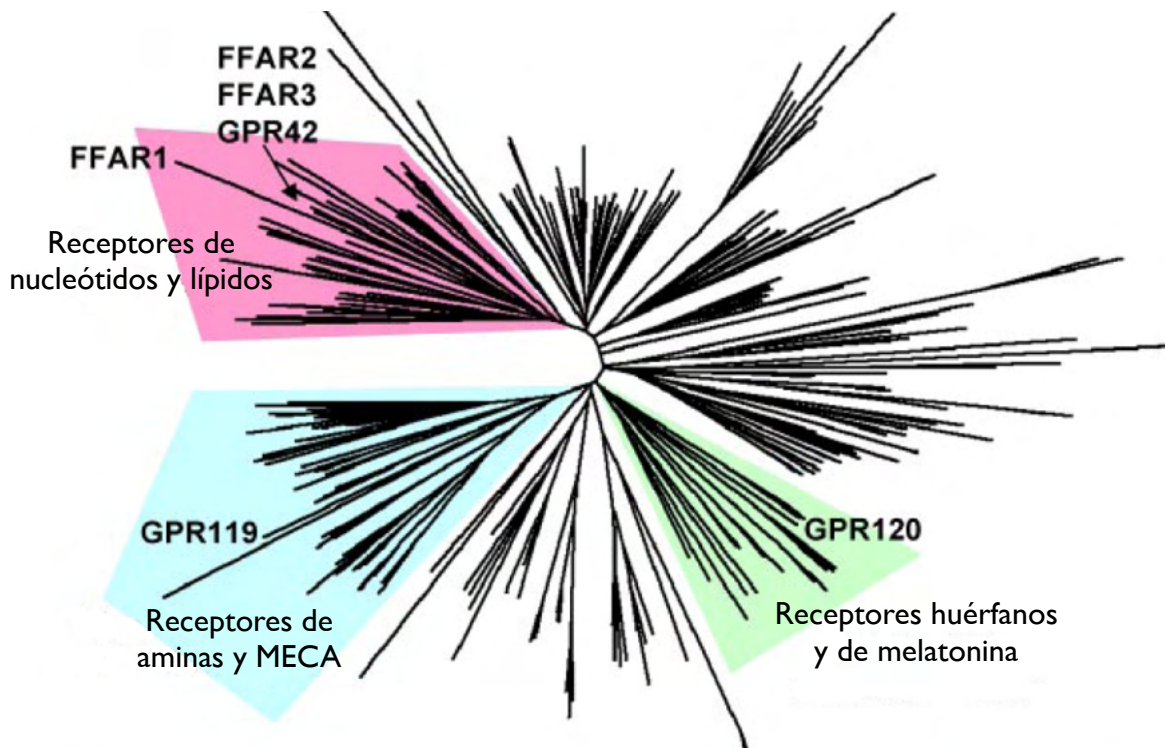


Figura 3. Árbol filogenético de la familia de rodopsina de 7TMRs. Los FFA1, FFA2 y FFA3 forman un grupo de receptores que pertenece a la familia de receptores de lípidos y nucleótidos. El GPR120 (FFA4) pertenece a la subfamilia que comprende a los receptores de melatonina, así como receptores huérfanos. Imagen modificada de Costanzi *et al.* 2008 (16).

Los receptores de ácidos grasos libres permanecieron huérfanos hasta que en el 2003 se demostró que ácidos grasos libres de cadena larga saturados e insaturados activaban al FFA1 (18-20), y que los FFA2 y FFA3 eran activados por ácidos grasos libres de cadena corta (21-23). El grupo de Briscoe demostró que varios ácidos grasos de cadena mediana y larga eran capaces de activar al receptor FFA1 en concentraciones micromolares. El ácido eicosatrienoico (C20:3) mostró ser el más potente con una EC_{50} aproximadamente

de 10 μM (18). Se demostró que el linolenato de metilo, éster derivado del ácido linolénico (C18:2 Ω 6), es incapaz de activar al receptor, lo que indica que el grupo carboxilo es esencial para la activación del receptor (19). Posteriormente ensayos a gran escala con el gen reportero de aequorina identificaron diversos FFAs como agonistas del FFA1, lo más sobresaliente fue que se identificaron los primeros agonistas no lipídicos del receptor. Se demostró que un fármaco en investigación indicado para obesidad, el MEDICA 16, y los fármacos sensibilizadores de insulina, las tiazolodinedionas; rosiglitazona y el MCC-555, eran capaces de activar al receptor (20). En estudios iniciales, donde se expresó el receptor FFA1 en células HEK293, se observó un incremento de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mediada por ácidos grasos de cadena larga, lo que sugiere el acoplamiento del receptor a proteínas $G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$. Además, se encontró que el receptor podía activar genes reporteros dependientes de $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{i/o}$ sin la necesidad de incluir proteínas G promiscuas exógenas (18). El apoyo a la suposición de que el receptor se puede acoplar a proteínas $G\alpha_{i/o}$ viene de la observación del bloqueo del incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por la toxina pertussis frente a la estimulación con ácidos grasos de cadena larga en la línea celular MCF-7 (24). La toxina pertussis genera el desacople de la proteína $G\alpha_{i/o}$ a los GPCRs.

Se confirmó, en sistemas recombinantes, que el FFA2 se activa por acetato y por varios ácidos grasos de cadena corta mediante ensayos de movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de unión de $[\text{S}^{35}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Estos estudios mostraron el siguiente orden de potencia de mayor a

menor: acetato y propionato igualmente potentes, seguidos por butirato, valerato y formiato (21).

Las actividades de los ácidos grasos de cadena corta son similares para el FFA3, lo que es de esperarse dada la alta similitud de las secuencias de los dos receptores (43% de similitud de aminoácidos en relación al FFA2). Sin embargo, se encontraron diferencias en la relación estructura actividad de los compuestos. Propionato, valerato y butirato son los ácidos grasos más potentes para activar al FFA3. Los receptores FFA2 y FFA3 tienen agonistas en común y una distribución tisular similar, sin embargo, muestran una especificidad distinta en su acoplamiento a proteínas G. Es aceptado que el receptor FFA2 se acopla principalmente a proteínas sensibles a toxina pertussis $G\alpha_{i/o}$, a pesar de haber evidencia de acoplamiento a proteínas G sensibles e insensibles a toxina pertussis. Por otro lado se mostró que el FFA3 se acopla eficientemente a la proteína G sensible a toxina pertussis $G\alpha_{o1}$ (21-23).

El FFA1 se expresa fuertemente en las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans, aunque también está localizado en las células α donde puede estar involucrado en la liberación de glucagon. En el intestino, la expresión de FFA1 es mucho menor pero es detectable. Al utilizar ratones knock in $Gpr40^{+/lacZ}$ el FFA1 no se encontró en hígado, cerebro, músculo ni tejido adiposo (25). No obstante, se ha sugerido que el FFA1 se expresa ubicuamente en el cerebro humano, con una alta expresión en la sustancia nigra y la médula oblongata (18). Esta suposición se basa en el uso de un anticuerpo al parecer específico contra el FFA1 en el cerebro de mono, que muestra una expresión generalizada del receptor

en el cerebro (26). La expresión del FFA1 también se ha reportado en células del sistema inmune, con los niveles más altos de mRNA detectados en monocitos (18).

El mRNA de FFA2 esta presente en grandes cantidades en células inmunes como los neutrófilos, los monocitos, las células mononucleares periféricas, los linfocitos B y las células polimorfonucleares. La expresión del FFA2 en células inmunes es de esperarse ya que el receptor se clonó por primera vez a partir de leucocitos (27). También se ha encontrado expresado en músculo esquelético, corazón y tejido adiposo (28). En el sistema digestivo se ha encontrado en células de la mucosa del íleon e intestino grueso, células enteroendocrinas, en algunos tipos de células de la lamina propia incluyendo; mastocitos, neutrófilos, eosinofilos y epitelio del colon (29, 30).

Por otro lado, se encontraron niveles altos de mRNA de FFA3 en tejido adiposo, seguida de una expresión menor en páncreas, bazo, nódulos linfáticos, médula ósea y células mononucleares periféricas (21, 22). La expresión del FFA3 en la mucosa del intestino delgado y grueso es similar a la del FFA2, teniendo niveles elevados en intestino delgado distal (íleon) y en colon proximal (31). Cabe resaltar que dos patentes sometidas por Arena Pharmaceuticals (World Patent No WO2006052566 y WO2006036688) indican que hay una regulación positiva, un incremento en la expresión, del FFA2 y FFA3 en ratones db/db diabéticos, esto indica que los receptores pueden funcionar como posibles blancos terapéuticos. Estas patentes se sometieron para proteger compuestos estabilizadores de insulina que modulan la función de los receptores FFA3 (WO2006052566) y FFA2 (WO2006036688).

La expresión del FFA4 es alta en células intestinales. Experimentos de hibridación *in situ* muestran una colocalización del FFA4 con el GLP-1 (péptido similar a glucagón 1) en células enteroendócrinas de la mucosa intestinal, particularmente las del colon (14). El FFA4 se expresa en células enteroendócrinas de tipo L donde, por estimulación de FFAs luminales, regula la secreción del GLP-1 y CCK (colecistocinina) a la circulación (14). En el epitelio del duodeno y el yeyuno el mRNA de FFA4 y FFA1 está expresado en células K sintetizadoras de GIP (péptido inhibidor gástrico). El FFA4 también está expresado abundantemente en macrófagos de tejido adiposo, adipocitos y en células de Kupffer (32). El receptor FFA4 humano se clonó y se demostró que era activado por FFAs de cadena larga (14), así mismo se demostró que se acopla a la proteína $G_{q/11}$ (33).

La distribución tisular de estos receptores indica que el grupo de FFA1 y el FFA4 juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los ejes metabólicos (34). En numerosos estudios en animales y en humanos, la obesidad se ha asociado a un estado de inflamación crónico moderado en el hígado y en el tejido adiposo. Esta inflamación incluye la activación del sistema inmune innato y la aparición de células inmunes que incrementan los niveles de citocinas proinflamatorias. Estos niveles elevados atenúan la acción de la insulina e incrementan la acumulación de lípidos (35, 36).

Estudios recientes indican que las vías del NF- κ B (factor nuclear de cadena ligera kappa estimulador de células B activadas) y de la JNK (cinasa de la región amino terminal del producto del gen c-jun) juegan papeles importantes en la comunicación entre los macrófagos, los adipocitos y las células de hígado (37-39). Se demostró que el FFA4, se

regula positivamente en ratones obesos (32), además de que la activación de este receptor genera un potente efecto antiinflamatorio, se observó que alivia la resistencia a la insulina y otras manifestaciones del síndrome metabólico en ratones. Estudios previos muestran que los FFAs saturados promueven una inflamación en adipocitos y macrófagos a través de la activación de los receptores tipo Toll 4 (TLR4) (40). Sin embargo, esto no se ha demostrado con FFAs poliinsaturados; de hecho, se ha observado que los FFAs $\Omega 3$ como el DHA y el EPA tienen efectos antiinflamatorios (41).

La activación del FFA4 por DHA antagoniza los efectos proinflamatorios del TNF α (factor de necrosis tumoral alfa) y del lipopolisacárido (LPS) en macrófagos previniendo la expresión de citocinas proinflamatorias. Se ha propuesto que después de la unión del ligando al receptor FFA4 las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) fosforilan al receptor. Esto genera un sitio de unión para las β -arrestinas, las cuales participan en la internalización y la regulación negativa (degradación) de GPCRs. Sin embargo, las β -arrestinas también pueden interactuar con efectores posteriores de vías de señalización (42). Experimentos de silenciamiento de genes mostraron que la β -arrestina 2 es indispensable para los efectos antiinflamatorios del DHA en macrófagos, y que la presencia de G_q no es necesaria para este efecto. Se demostró que la β -arrestina 2 logra el efecto antiinflamatorio secuestrando a la proteína de unión a TAK1 (cinasa 1 activada por factor de crecimiento transformante β), TAB1. El secuestro de TAB1 previene que el complejo TAK1 y TAB1 fosforile a las cinasas I κ B (cinasa del inhibidor de NF κ B) y MKK4

(proteína cinasa cinasa activada por mitógenos 4) que se encuentran antes en la cascada de señalización de NF κ B y JNK respectivamente (32) (Figura 4).

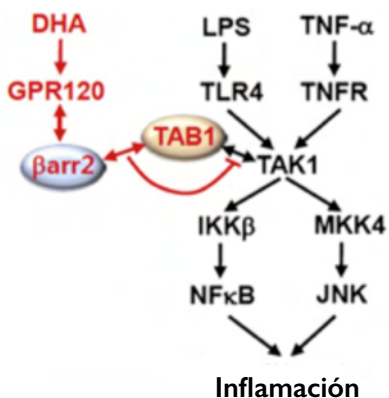


Figura 4. Esquema del mecanismo antiinflamatorio mediado por el GPR120 y la β -arrestina 2. Las líneas y letras rojas indican el efecto antiinflamatorio mediado por DHA, las letras negras y líneas negras indican las vías inflamatorias inducidas por LPS y TNF α . Imagen modificada de Oh *et al* 2010 (32).

El grupo de Oh demostró que una dieta rica en grasas suplementada con DHA y EPA no muestra los efectos negativos que tiene una dieta rica en grasas en la homeostasis de la glucosa y en el almacenamiento de lípidos; por ejemplo, la esteatosis (proceso anormal de retención de lípidos dentro de la célula). Observaron que el DHA y EPA revierten la resistencia a insulina generada por una dieta rica en grasas. La falta del gen GPR120 elimina los efectos benéficos de estos FFAs en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a insulina. Al parecer estos beneficios están mediados por los macrófagos, ya que ratones de genotipo silvestre que reciben un trasplante de medula ósea de ratones KO-GPR120 no observan estas mejorías (32).

El grupo Oh también propuso un modelo que explica cómo es que los FFAs omega 3 mantienen la sensibilidad a insulina a través del GPR120 (43). En este modelo se muestra que una dieta con una proporción balanceada de ácidos grasos saturados e insaturados omega 3 genera que los macrófagos antiinflamatorios M2 reduzcan la inflamación en el

tejido adiposo. Por consiguiente se mantiene el tejido sensible a la insulina. Por otro lado, cuando se tiene una dieta con una mayor proporción de ácidos grasos saturados frente a ácidos grasos omega 3, se activa el receptor TLR4 en macrófagos y adipocitos y se induce la síntesis de quimiocinas como la CCL-2 (ligando de quimiocina 2 de dominio C-C). Esta quimiocina recluta a monocitos proinflamatorios M1 al tejido adiposo (43, 44) (Figura 5).

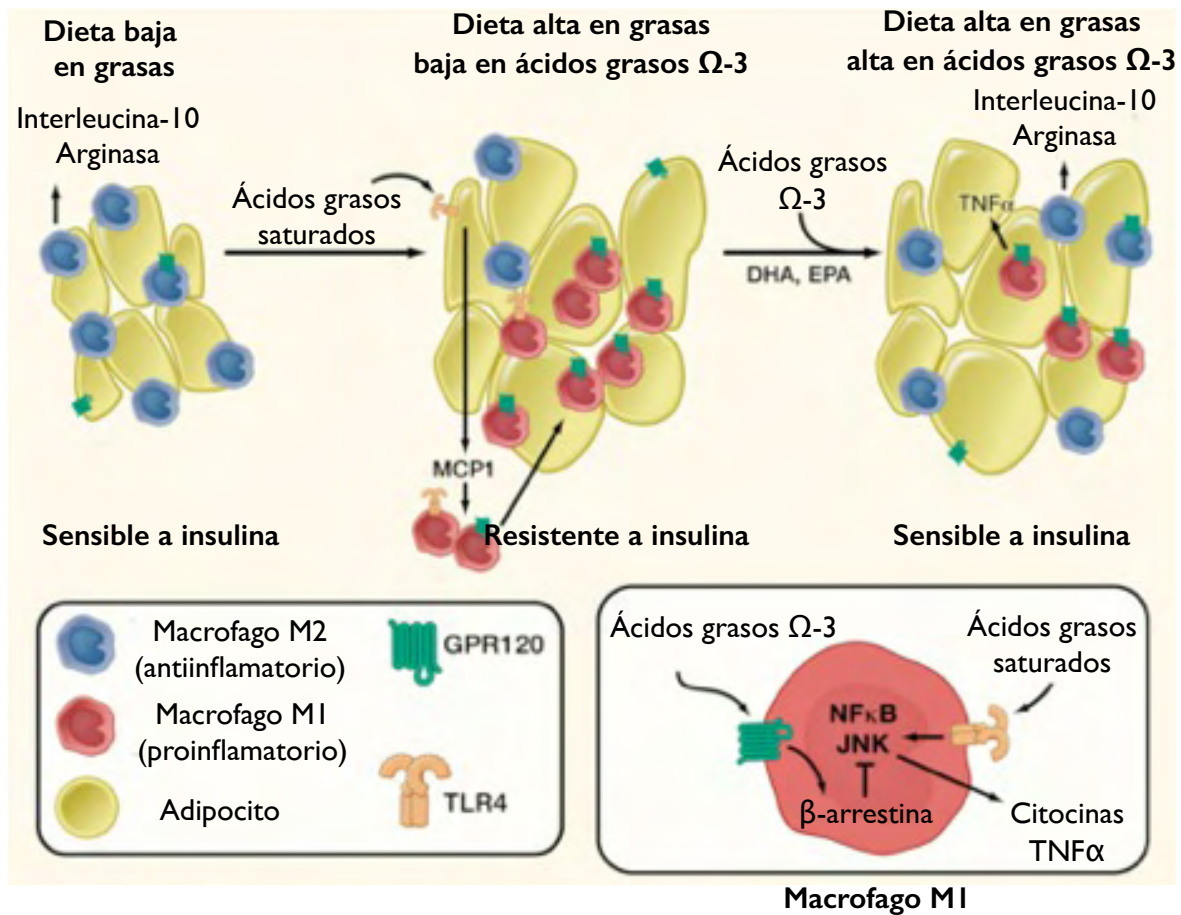


Figura 5. Modelo de la recuperación de la sensibilidad a insulina mediante la activación del GPR120. Imagen modificada de Saltiel 2010 (43).

En humanos, existen dos isoformas del receptor GPR120 que son variantes de splicing (45). La forma corta del receptor (GPR120S) tiene 361 residuos, mientras que la

forma larga (GPR120L) tiene 16 residuos adicionales en la tercera asa intracelular (ICL3). En la familia de rodopsina de GPCRs se ha demostrado que la ICL3 le permite a los receptores acoplarse a las proteínas G y a β -arrestinas (46). En un estudio reciente, se demostró que las variantes de splicing tienen diferencias en su señalización; los resultados indican que la variante GPR120L señala únicamente a través de β -arrestinas. Se cree que esto se debe a que los 16 aminoácidos adicionales en el ICL3 limita su acople con la proteína $G\alpha_{q/11}$ (47). Cabe destacar que los efectos fisiológicos antiinflamatorios son mediados por la señalización del receptor mediada por β -arrestinas. (*Figura 6*).

En sujetos obesos se encontró una mutación no sinónima, R254H en la corta y R270H en la forma larga del receptor. Al parecer este receptor mutante no señala e inhibe la señalización del receptor GPR120 silvestre. (48, 49) (*Figura 7*).

3.4. Proteína cinasa C como regulador de la función de GPCRs.

La familia de cinasas serina treonina de PKC constituye aproximadamente el 2% de las cinasas en el humano. Estas proteínas están muy conservadas en eucariontes y su complejidad en cada organismo va desde una sola isoforma en levadura (*S. cerevisiae*) a 12 isoformas en mamíferos (50). El gran número de isoformas en mamíferos, así como el empalme de la especificidad de sustratos entre las diferentes isoformas ha complicado la asignación de funciones específicas de cada una de ellas. Sin embargo, muchos estudios

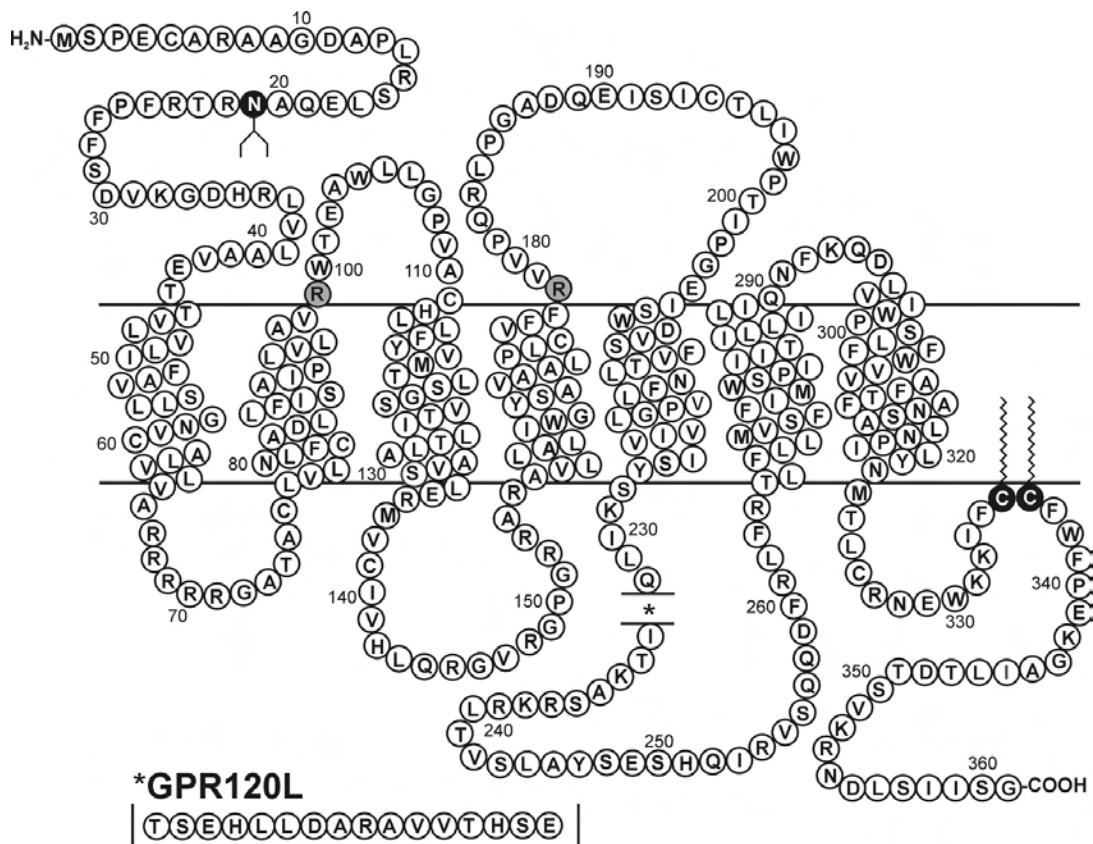


Figura 6. Secuencia de aminoácidos del receptor humano GPR120S. Se indica la posición de los 16 residuos adicionales en la tercera asa intracelular de la isoforma larga del receptor, GPR120L(*). Se indican los sitios probables de N-glicosilación y palmitoilación (letras blancas con círculos negros). Se muestran argininas que tienen una probable interacción con el grupo carboxilo del agonista. Imagen modificada de Watson *et al.* (2012) (47).

apoyan la noción de papeles sutiles pero individuales para cada uno de los miembros de esta familia (51).

Todas las isoformas de PKC comparten un dominio cinasa muy conservado en el carboxilo terminal que está ligado por una región de bisagra a un dominio regulador en el amino terminal. Cuando la PKC está inactiva se autoinhibe por una secuencia de pseudosustrato que está presente en el dominio regulador. Esta secuencia ocupa la cavidad de

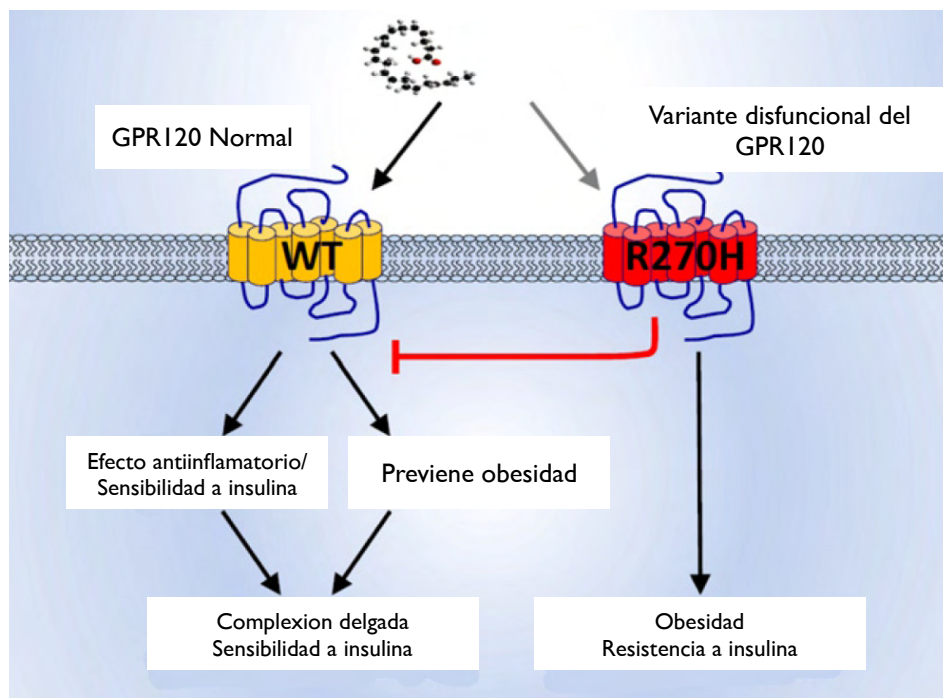


Figura 7. El GPR120 es un receptor de FFAs omega 3 y la pérdida de su función lleva a obesidad y resistencia a insulina. Una fracción pequeña ($\approx 3\%$) de sujetos obesos tiene la variante no sinónima (R270H) con sus propiedades de señalización afectadas intrínsecamente. Esta variante inhibe la activación por FFAs omega 3 del GPR120 silvestre. En poblaciones europeas esta variante está asociada al incremento en el riesgo de obesidad y resistencia a insulina, además de que los ratones KO-GPR120 también desarrollan obesidad y resistencia a la insulina. Imagen modificada de Oh *et al.* 2012 (49).

unión a sustrato evitando la catálisis del dominio cinasa funcional. La PKC se activa por segundos mensajeros y/o por efectores alostéricos que se unen a su dominio regulador, típicamente en la membrana plasmática. Esta unión modifica el anclaje del dominio regulador al dominio cinasa. Una vez que la región pseudosustrato unida al sitio catalítico se desplaza la PKC queda activada (52).

La familia de PKC puede dividirse en cuatro grupos con diferente estructura y función en relación a la especificidad de sus dominios reguladores. Las PKCs convencionales o clásicas (cPKC) que comprende a PKC α , PKC β y PKC γ . Esta familia es

activada por la combinación de la unión de diacilglicerol y fosfolípido al dominio región conservada 1 (C1) y la unión dependiente de Ca^{2+} de fosfolípido al dominio región conservada 2 (C2). Los dominios C1 y C2 forman parte del dominio regulador de la proteína. Las PKC nuevas (nPKC), que incluyen PKC δ , PKC ϵ , PKC θ , y PKC η , son activadas también por diacilglicerol y fosfolípidos pero no responden directamente a Ca^{2+} . Las PKC atípicas (aPKC), PKC ι (PKC λ en ratón) y PKC ζ no dependen de Ca^{2+} o diacilglicerol para su activación sino que son activadas alostéricamente por la interacción de su dominio Phox/Bem1 (PB1) con el complejo PAR6-CDC42, el cual está involucrado en especificar la polaridad celular. La subfamilia PKN; PKN1, PKN2 y PKN3 comparte un modo alostérico de regulación dependiente de proteínas G. Esta familia de PKC contiene segmentos de unión a la región de homología 1 (HR1) en sustitución a un dominio regulador PB1. La unión bivalente de los segmentos HR1a y HR1b con las GTPasas Rho y Rac libera la región pseudosustrato de PKN lo que resulta en la activación de la cinasa (50). Sumado a estos estímulos específicos para la regulación de PKCs, otros procesos tienen un impacto en su función. Estos procesos incluyen modificaciones covalentes o modificaciones en la interacción con proteínas de unión específicas (*Figura 8*).

Las isoformas de PKC deben ser preparadas para que puedan ser activadas posteriormente (53). El mantenimiento de la forma latente de PKC requiere que el dominio catalítico tenga una estructura que le permita unirse a sus proteínas sustrato y autoinhibirse por la unión al pseudosustrato. Para lograr este estado competente los dominios cinasa son fosforilados en tres (cPKCs y nPKCs) o dos (aPKCs y PKNs) residuos de serina o treonina.

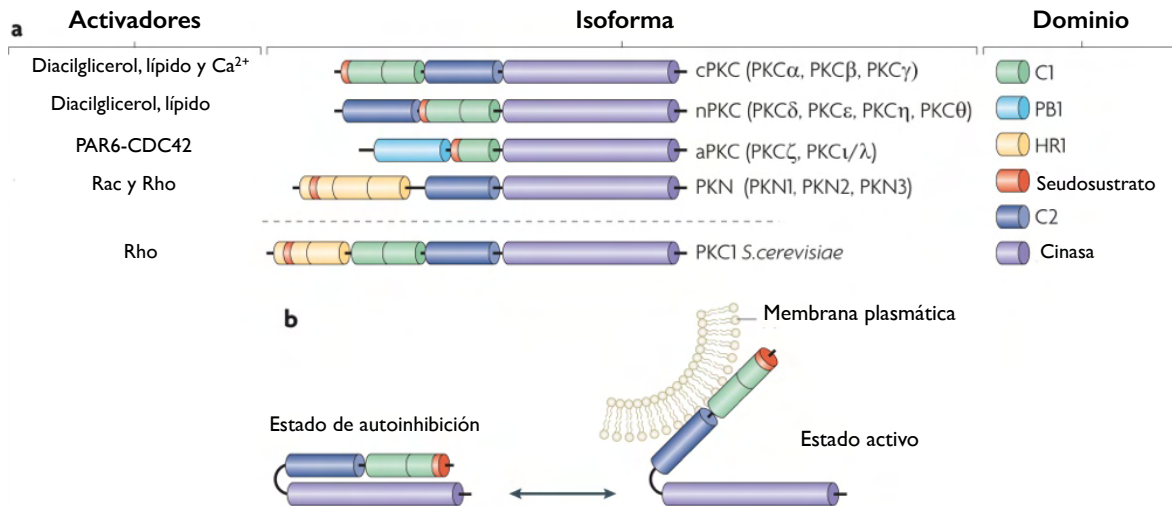


Figura 8. Familia de PKC. **a.** Esquema de los dominios de las isoformas de PKC en mamíferos arriba de la PKC1 de *S. cerevisiae*. En mamíferos los miembros de la familia de PKC se dividen en cuatro subgrupos de acuerdo a sus dominios reguladores: cPKC, nPKC, aPKC y las cinasas parecidas a PKC, las PKN. **b.** Activación de una cPKC, cuando su dominio regulador es reclutado a la membrana plasmática por la presencia de Ca²⁺, fosfolípido y diacilglicerol. La auto inhibición de la proteína se libera y el dominio cinasa puede fosforilar a sus sustratos. Imagen modificada de Rosse *et al.* 2010 (55).

Estas modificaciones estabilizan las conformaciones activas del dominio cinasa que permite la conversión del estado latente inhibido en conformaciones con actividad catalítica óptima (54).

Está implícito en esta conceptualización de la función de las isoformas de PKC que las formas no fosforiladas son formas abiertas incompetentes catalíticamente, con los dominios C1 y C2 completamente expuestos. Estas formas abiertas de la proteína pueden afectar marcadamente el comportamiento celular por sus dominios constitutivamente expuestos. Sin embargo, estas conformaciones son, en parte, secuestradas por chaperonas (55).

La preparación de las isoformas de PKC requiere de dos cinasas río arriba. Una es la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1), que también es responsable de la fosforilación de varias proteína cinasas serian treonina de la familia de cinasas AGC. La familia AGC de proteína cinasas incluye a PKA, PKC, PKG, GRKs, entre otras. La PDK1 fosforila el giro de activación en el dominio cinasa. Este giro tiene una estructura variable y se encuentra típicamente entre los lóbulos de cinasa superior (KinU) e inferior (KinL). Después de la fosforilación por PDK1 se modifica el alineamiento mutuo de los lóbulos de cinasa y esto determina el potencial catalítico de la PKC. La segunda cinasa es el complejo blanco de rapamicina 2 de mamíferos (mTORC2) que controla la fosforilación de la región de giro en la cola carboxilo terminal de las PKCs. Tomando en cuenta la estructura resuelta del dominio cinasa de PKC β se piensa que estas fosforilaciones ayudan a estabilizar la conformación activa del dominio cinasa porque limitan el movimiento de los lóbulos del dominio cinasa. (54-57) (Figura 9).

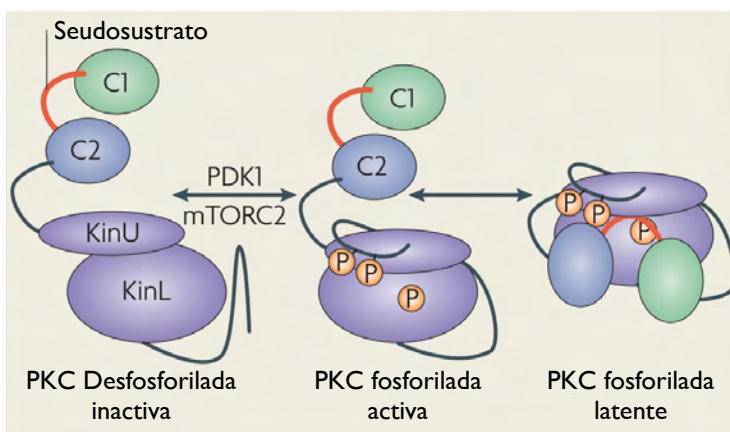


Figura 9. Generación del estado preparado de PKC mediado por fosforilaciones de PDK1 y mTOR2. Imagen modificada de Rosse *et al.* 2010 (55).

El modelo clásico de desensibilización de GPCRs describe la pérdida de la respuesta del receptor subsecuente a la administración prolongada o repetida de un agonista. No obstante, el término prolongada puede ser engañoso porque puede representar tiempos tan pequeños como segundos o tiempos largos como horas o incluso días. Existen dos tipos de desensibilización: la homóloga y la heteróloga. La homóloga se refiere a la pérdida de la respuesta porque los agonistas actúan en un subtipo de GPCR determinado. La heteróloga se refiere a un efecto más generalizado que involucra la pérdida simultánea de la respuesta al agonista de múltiples subtipos de GPCRs en la ausencia de agonistas ocupando dichos receptores. Se piensa que en la desensibilización homóloga intervienen cambios adaptativos al nivel del GPCR del que se trata, mientras que en la desensibilización heteróloga también intervienen cambios en los componentes río abajo de la señalización del GPCR.

Después de la desensibilización, si el agonista se ha quitado o se adicionó un antagonista, la capacidad de respuesta del receptor en la mayoría de los casos puede ser recuperada por un proceso llamado resensibilización (58).

El mecanismo más reconocido de desensibilización de GPCRs es mediada por la fosforilación de los receptores (*Figura 10*). Hasta mediados de la década de los ochenta del siglo pasado, la fosforilación de los GPCRs por cinasas dependientes de segundos mensajeros como la proteína cinasa A y la proteína cinasa C se creía el mecanismo principal de desensibilización. Sin embargo, la observación de que el receptor β 2-adrenérgico podía ser fosforilado y desensibilizado en células sin una PKA funcional señaló

la existencia de otras cinasas responsables de fosforilar a los GPCRs. Se identificó una nueva proteína cinasa no dependiente de segundos mensajeros, con la habilidad de fosforilar al receptor β 2-adrenérgico ocupado por su agonista. Esta cinasa, que se llamó en un inicio cinasa del receptor β -adrenérgico (β -ARK), pertenece a una familia de cinasas que posteriormente se denominaron cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs). La β -ARK después asumió el nombre de GRK2. La sola presencia de las GRKs no es suficiente para desensibilizar al receptor. Posteriormente se identificó otra familia de proteínas reguladoras que se denominaron arrestinas, las cuales tienen alta afinidad por el receptor fosforilado. Esta unión genera el desacople del receptor con la proteína G y esto conlleva a una subsecuente disminución de la respuesta generada por el receptor (46, 59-62).

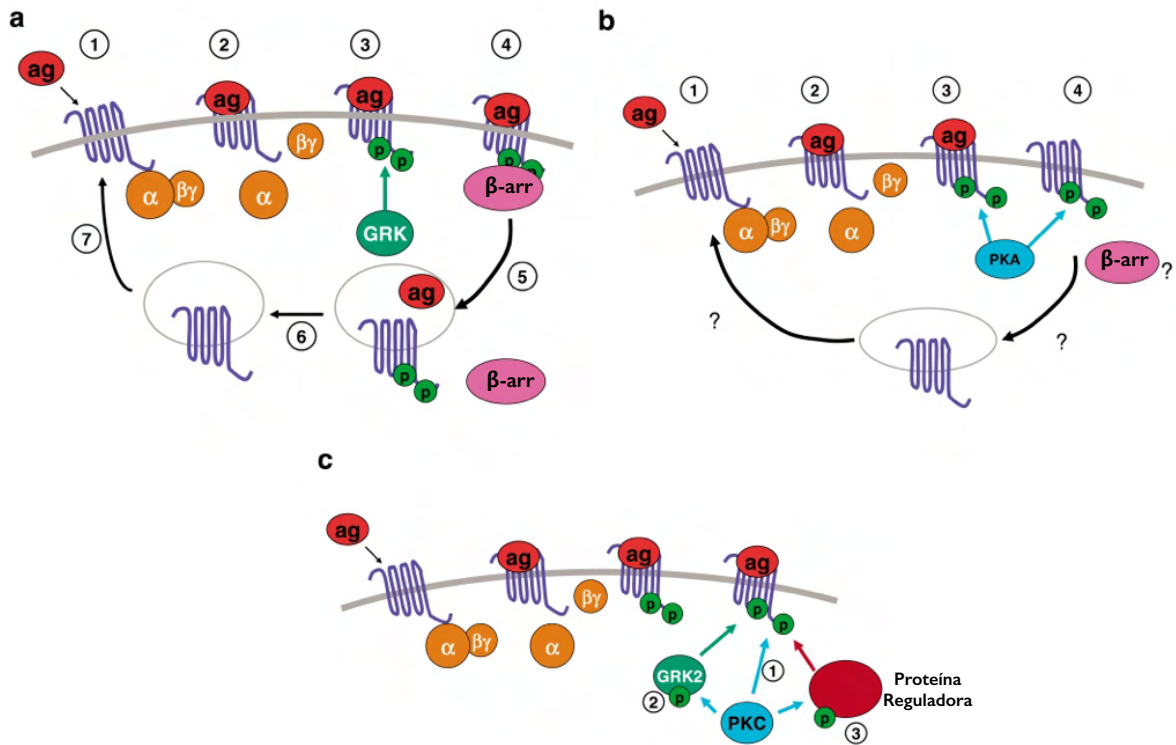


Figura 10. Regulación de GPCRs por GRKs y cinasas dependientes de segundos mensajeros. *a.* Modelo clásico de regulación por GRKs y arrestinas. El GPCR es activado por el agonista (1) provocando el acople a la proteína G (2) con la subsecuente modulación de efectores. Después el GPCR ocupado por el agonista es fosforilado por GRKs (3) y las arrestinas se unen al receptor fosforilado, con la subsecuente desensibilización (4), internalización (5), desfosforilación (6) y reciclamiento (7) del GPCR. Particularmente con tratamientos prolongados con el agonista, el receptor internalizado puede ser regulado negativamente, es decir degradado. *b.* Regulación por cinasas dependientes de segundos mensajeros. Se muestra como ejemplo la proteína cinasa A (PKA). En este ejemplo el agonista se une al receptor (1) generando la activación de la proteína G_s (2) que incrementa los niveles de AMP cíclico que activan la PKA. Esta cinasa es capaz de fosforilar GPCRs ocupados por agonista (3) o sin agonista (4). Esta fosforilación causa la desensibilización del receptor por el desacople del GPCR con la proteína G o en el caso del GPCR sin agonista previniendo el acople de la proteína G. Si esta fosforilación es seguida por la unión a β -arrestinas e internalización depende del subtipo de GPCR en cuestión. *c.* Mecanismo de regulación directa e indirecta por cinasas dependientes de segundos mensajeros. En el ejemplo, la PKC activada puede fosforilar y desensibilizar directamente al GPCR (1), o la PKC puede fosforilar y activar a GRK2, que en consecuencia incrementa su habilidad de fosforilar al receptor (2), o la PKC puede fosforilar otras proteínas reguladoras desconocidas que participan en la desensibilización del receptor (3). Imagen modificada de Kelly *et al.* 2008 (62).

4. Planteamiento del problema

En la literatura se han reportado poco los mecanismos de desensibilización del receptor GPR120. Como se menciono anteriormente, se sabe que el receptor GPR120 se internaliza después de ser activado por FFAs de cadena mediana y larga, y que esta internalización esta mediada por la unión del receptor con la β -arrestina 2. También se sabe que el receptor se acopla a la proteína $G\alpha_q$, lo que conlleva un incremento en la concentración de calcio intracelular. Tomando en cuenta el acople con la proteína $G\alpha_q$ es muy probable que la proteína cinasa C este involucrada en la regulación de este receptor. Los GPCRs en su mayoría, son regulados por fosforilación. Por consiguiente, en el laboratorio proponemos que estudiar los estados de fosforilación del receptor frente a diversos estímulos nos puede ayudar a caracterizar los mecanismos responsables de la regulación del mismo.

Así mismo, caracterizar los mecanismos que intervienen en la regulación de este receptor puede contribuir al diseño de fármacos que ayuden en desordenes metabólicos.

5. Hipótesis

El receptor GPR120 se fosforila al activarse por sus agonistas, el DHA y el α -LA, y por la activación directa de la proteína cinasa C con el éster de forbol PMA. Tomando en cuenta lo observado en otros GPCRs, esta fosforilación llevará a la desensibilización del receptor GPR120 de forma homóloga después de activarse por sus agonistas y de forma heteróloga después de su fosforilación inducida por la activación directa de la proteína cinasa C por ésteres de forbol (*Figura 11*).

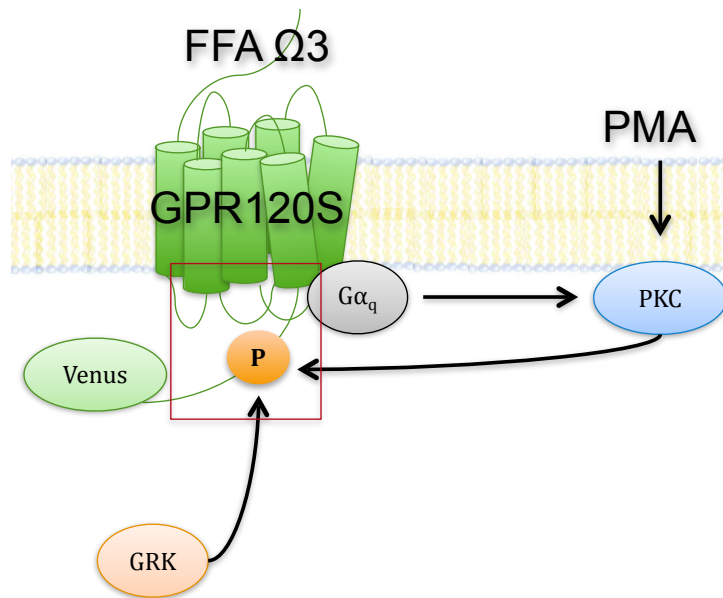


Figura 11. Modelo propuesto de la regulación del receptor GPR120 mediada por fosforilación.

6. Objetivos

Objetivo General

Estudiar los mecanismos de desensibilización homóloga y heteróloga del receptor GPR120

Objetivos Particulares

- I. Evaluar la funcionalidad de la proteína de fusión GPR120-Venus con ensayos de calcio intracelular.
- II. Evaluar el estado de fosforilación de la proteína en su estado basal y después de la estimulación con agonistas del receptor GPR120 o con el éster de forbol PMA.
- III. Evaluar la participación de las isoformas de PKC en la fosforilación dependiente de agonistas y en la dependiente del éster de forbol.
- IV. Evaluar el grado de internalización del receptor después del estímulo con el agonista o con el éster de forbol utilizando microscopía confocal.

7. Métodos

7.1. Líneas Celulares

La línea estable GPR120S-Venus se generó en el laboratorio del Dr. Gozoh Tsujimoto de la Universidad de Kyoto utilizando el sistema Flp-In T-REx de Invitrogen (63). Se transfectó la línea celular HEK293 Flp-In T-REx con el vector de expresión pcDNA5/FRT/TO, vector de expresión regulado por el represor de tetraciclina de Invitrogen. A este vector se le insertó la proteína de fusión del receptor FLAG-GPR120S con la variante de YFP, Venus (64). Esta línea celular, que se denominó GPR120S-Venus, se cultivó en medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37 °C a una atmósfera de CO₂ al 5%. La expresión de la proteína de fusión GPR120S-Venus se indujo con doxiciclina 1 µg/mL 24-36 horas antes de los experimentos.

7.2. Construcción de proteínas de recombinantes

La secuencia clonada del receptor GPR120S humano con la etiqueta FLAG en el amino terminal se fusionó en el extremo carboxilo con la secuencia de la proteína Venus. La proteína Venus es una mutante (F46L) de la YFP. Esta mutación acelera la maduración por oxidación del cromóforo a 37°C; además aumenta el rendimiento cuántico (mayor emisión con relación a la cantidad de luz utilizada para excitar al fluoróforo) y la estabilidad al

fotoblanqueo, en comparación con otras variantes de la proteína amarilla fluorescente. De ahí su nombre que hace referencia al objeto más brillante del cielo nocturno (64).

Se utilizó el sistema combinado Flp-In T-REx de Invitrogen para generar una línea estable HEK293 que exprese la proteína GPR120S-Venus de forma inducible con doxiciclina. El sistema Flp-In se basa en el sistema de recombinación de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la recombinasa FLP del mismo. Mientras que el sistema T-REx se basa en el uso del un promotor híbrido inducible con tetraciclina (*Figura 12*).

El sistema combinado Flp-In T-REx utiliza cuatro vectores para la generación de líneas estables. El primero es el plásmido pFRT/lacZ-Zeo que sirve como blanco de recombinación para la incorporación del gen deseado, el FRT es el sitio de reconocimiento de la recombinasa FLP. Este vector, además de tener el sitio de reconocimiento de la recombinasa, tiene el gen fusionado lacZ-Zeocina que codifica una proteína de fusión de β -galactosidasa y la proteína Sh ble. La proteína Sh ble, cuya expresión esta controlada por el promotor SV40, confiere resistencia a zeocina por que se une al antibiotico y bloquea la ruptura del DNA generada por el mismo. El FRT está insertado río abajo del codón de inicio ATC de la proteína de fusión lacZ-Zeocina. Este vector es transfectado en la línea celular deseada, en este caso HEK293, y las células transfectadas son seleccionadas con zeocina.

El segundo vector del sistema es el plásmido pcDNA6/TR que expresa constitutivamente el represor Tet, que es regulado por tetraciclina. El plásmido también tiene el gen de resistencia a blasticidina. Los dos primeros vectores son transfectados

secuencialmente para generar líneas celulares resistentes a zeocina y blasticidina. A estas células se les denomina células parentales, en este caso las células parentales son HEK293 Flp-In T-REx.

El tercer vector es el plásmido pcDNA5/FRT/TO en el cual está clonado el gen de interés. La expresión del gen está bajo el control del promotor CMV, el cual contiene dos copias en tándem del operador 2 de tetraciclina, TetO2, separados por un espaciador de dos bases. El vector tiene el gen de resistencia a higromicina, el cual no tiene promotor ni codón de inicio, pero tiene una región FRT en la región codificante 5'.




El cuarto vector es el plásmido pOG44 que expresa constitutivamente la recombinasa Flp y está bajo el control del promotor CMV.

El tercer y cuarto vectores se cotransfectan en la línea parental que fue previamente seleccionada con zeocina y blasticidina. Después de la transfección, la recombinasa expresada constitutivamente genera un evento de recombinación homóloga entre los sitios FRT. De esta forma se obtienen líneas celulares que pueden ser seleccionadas por su resistencia a higromicina, resistencia a blasticidina, sensibilidad a zeocina, falta de actividad de β -galactosidasa y expresión del gen insertado bajo inducción con tetraciclina

7.3. Medición de calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$)

Se utilizó una caja Petri de 10 cm confluyente de células GPR120S-Venus. Para evitar una estimulación previa con FFAs presentes en el medio complementado, las células se

- Células parentales HEK293 Flp-In T-Rex resistentes a zeocina y blastidina
- Cotransfección de vector pcDNA5/FRT/TO/GPCR y pOG44
- El pcDNA5/FRT/TO/GPCR se integra al sitio FRT por la catálisis de la recombinasa Flp del pOG44. Células resistentes a blastidina e higromicina. La proteína TetR se une al tetOp y reprime la expresión del GPCR.
- Adición de tetraciclina o doxiciclina al medio de cultivo.
- La tetraciclina/doxiciclina se une a la proteína TetR la cual libera el tetOp permitiendo la expresión del GPCR

Represor Tet (TetR) = 
 Tetraciclina / doxiciclina = 
 GPCR = 

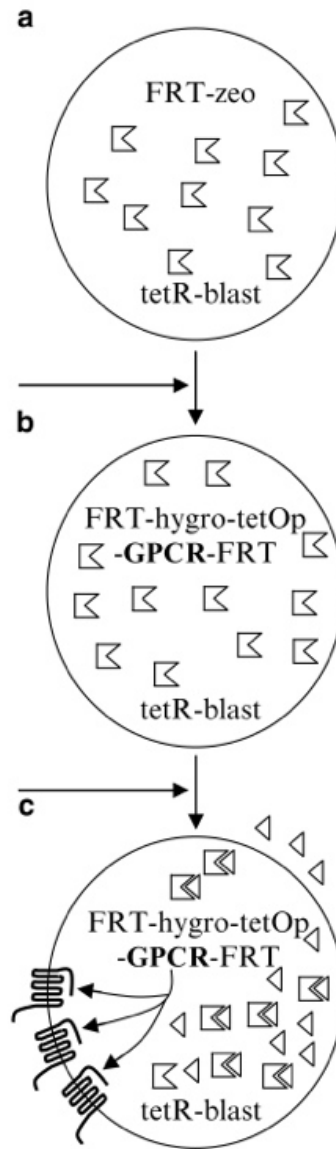


Figura 12. Representación esquemática del proceso para generar líneas celulares Flp-In T-Rex que expresan un GPCR de una forma estable e inducible. *a.* Línea celular blanco Flp-In T-Rex HEK293 que contiene los sitios de recombinación FRT y expresa el represor tet. Después de la transfección, *b,* el vector pcDNA5/FRT/TO con el GPCR de interés se integra en el sitio FRT y el represor tet se une a los operadores tet bloqueando la expresión del GPCR. *c.* Después de adicionar tetraciclina o doxiciclina ésta se une al represor, libera al promotor y permite la expresión del GPCR. Imagen modificada de Ward *et al* (2011) (63).

mantuvieron por dos horas en medio de cultivo sin suero. Este tiempo se determinó empíricamente viendo la condición del cultivo y tomando en cuenta trabajos previos del laboratorio y de otros autores que utilizaron células HEK293. Después se incubaron a 37°C una hora con Fura2-AM 2.5 μ M en solución amortiguadora Krebs-Ringer-Hepes con albúmina. Posterior a la incubación, se retiró la solución y las células se levantaron de la caja Petri con una solución de tripsina. La reacción de tripsina se detuvo con la solución Krebs-Ringer-Hepes con albúmina por competencia de sustrato. Posteriormente, las células se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL y se lavaron dos veces con la solución Krebs-Ringer-Hepes con albúmina por centrifugación y resuspensión. Después del último lavado, las células se resuspendieron en solución Krebs-Ringer-Hepes sin albúmina, para evitar la unión de los agonistas con la albúmina durante la estimulación.

La determinación de $[Ca^{+2}]_i$ se realizó midiendo los cambios en fluorescencia generados por la estimulación de las células utilizando un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie 2. Las longitudes de onda de excitación fueron de 340 y 380 nm y la longitud de onda de emisión fue de 510 nm. La $[Ca^{+2}]_i$ se cuantificó utilizando el software incluido en el espectrofluorómetro a partir de la ecuación $[Ca^{+2}]_i = K_d [(R-R_{min})/(R_{max}-R)] [Sf2/Sb2]$, donde K_d es la constante de disociación de fluoróforo, en este caso Fura2 con el Ca^{+2} . R es la lectura de la fluorescencia en unidades arbitrarias, R_{min} es la fluorescencia mínima obtenida al adicionar EGTA (5 mM) a la cubeta y R_{max} es la fluorescencia máxima que se obtiene al lisar las células con Triton X-100 10% v/v. $Sf2$ y $Sb2$ son los coeficientes

de proporcionalidad del fluoróforo libre (Sf2) y el unido al calcio (Sb2) en la longitud de onda de 510 nm (65).

7.4. Fosforilación del receptor FFA4 (GPR120)

La línea celular estable GRP120S-Venus se cultivó en placas de 6 pozos. El día del experimento, las células se cargaron metabólicamente por tres horas a 37°C con 100 $\mu\text{Ci/mL}$ de fosfato inorgánico marcado isotópicamente con ^{32}P . Dependiendo del experimento las células se estimularon a la concentración indicada para la realización de curvas dosis respuesta, o la estimulación se mantuvo los tiempos indicados utilizando una concentración fija para generar los cursos temporales. Después de la estimulación dada, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos fría y se lisaron durante una hora sobre hielo con solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1% p/v, Nonidet P40 1% v/v, colato de sodio 1% p/v, NaF 20 mM, Na_3VO_4 100 μM , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, p-serina 1 mM, p-treonina 1 mM, p-tirosina 1 mM, EDTA 5 mM, leupeptina 20 $\mu\text{g/mL}$, bacitracina 5 mg/mL, fluoruro de metil sulfonilo 100 $\mu\text{g/mL}$ e inhibidor de tripsina de soya 50 $\mu\text{g/mL}$; pH 7.4). Los lisados se colectaron en tubos Eppendorf y centrifugados a 11,000 g por 15 minutos en una microcentrifuga Eppendorf. Los sobrenadantes de la lisis fueron transferidos a tubos nuevos y se les adicionaron 10 μL de anticuerpo anti-GFP (66) y 20 μL de proteína A agarosa y se dejaron bajo agitación toda la noche a 4 °C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 2,000 g por 5 min, se les retiró

el sobrenadante y las esferas de proteína A sefarosa se lavaron 5 veces por resuspensión y centrifugación con solución amortiguadora de lavado (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1% v/v, colato de sodio 1% p/v, NaF 20 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, EDTA 5 mM; pH 7.4). A las esferas lavadas se les agregó solución amortiguadora de Laemmli con DTT 100 mM, SDS 10% y urea 6 M (67). Las muestras se calentaron 80-100 °C en agua, se centrifugaron por cinco minutos a 11,000 g y se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida al 10%. Los geles secos se utilizaron para exponer placas del sistema phosphoImager de Molecular Dynamics, la cuantificación de la fosforilación se realizó en el programa Image J desarrollado por el NIH.

7.5. Microscopía y análisis de imágenes

Las imágenes de epifluorescencia y de contraste diferencial de fases se obtuvieron en un microscopio Olympus 1X71 invertido equipado con una cámara Evolution VF (Media Cybernetics). Para obtener las muestras de microscopía confocal y de TIRF las células se cultivaron en cajas Petri de fondo de vidrio, se estimularon y se fijaron con paraformaldehído al 10%. Posteriormente se observaron en un microscopio confocal FV10i de Olympus con un objetivo de 60X de inmersión en agua. La proteína fluorescente Venus se excitó con una longitud de onda de 473 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 527 nm. Para las imágenes de TIRF se utilizó un microscopio invertido Olympus 1X81 con sistema de iluminación de TIRF y un objetivo de TIRF 100X 1.45 de apertura numérica

Plan Achromat. Para excitar a la proteína Venus se utilizó un láser de argón de 488 nm. La edición de las imágenes obtenidas se realizó en el programa Image J desarrollado por el NIH.

7.6. Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones estadísticas de dos condiciones utilizando la prueba *t* de Student y comparaciones de condiciones múltiples utilizando la prueba de ANOVA seguida de una prueba de Bonferroni. En todas las comparaciones estadísticas $p < 0.05$ se consideró significativa.

8. Resultados

Inicialmente analizamos la localización de forma basal de la proteína de fusión FLAG-GPR120-Venus y la proteína Venus libre en las líneas celulares que se generaron en el laboratorio del Dr. Tsujimoto. Las líneas estables generadas expresan estas proteínas de forma inducible (Figura 13). Observamos un poco de fluorescencia antes de la inducción, pero es muy notorio el incremento de la fluorescencia después de la inducción. También notamos que la fluorescencia en las células GPR120-Venus parece estar más localizada en la membrana plasmática, a diferencia de las células expresando la proteína Venus sola, que parecen tener la proteína fluorescente en todo el cuerpo celular.

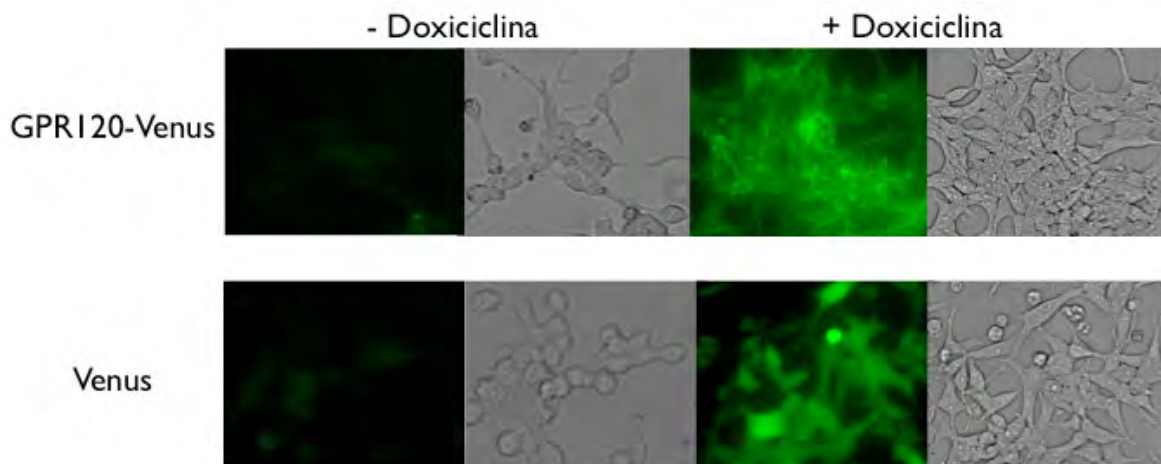


Figura 13. Epifluorescencia y contraste diferencial de fases de células transfectadas con los plásmidos de expresión de la construcción GPR120-Venus y la proteína Venus. Las microfotografías fueron tomadas antes de la inducción y 24 h después de la inducción con hiclato de doxiciclina 1µg/ml. La fluorescencia es mínima antes de la inducción e incrementa significativamente después de la inducción. Se puede observar que la proteína Venus libre está presente dentro del cuerpo celular mientras que la construcción de la proteína GPR120-Venus está localizada principalmente en membrana y en vesículas internas. Imagen representativa de 10 preparaciones diferentes de células observadas en objetivo 20X.

Para definir mejor la localización de la construcción GPR120-Venus decidimos utilizar microscopio de fluorescencia confocal (Figura 14). Con este microscopio observamos que el receptor se localiza principalmente en la membrana celular. También se observa la proteína de fusión en vesículas intracelulares, es probable que estas vesículas participen en el transporte del receptor desde su síntesis hasta su degradación.

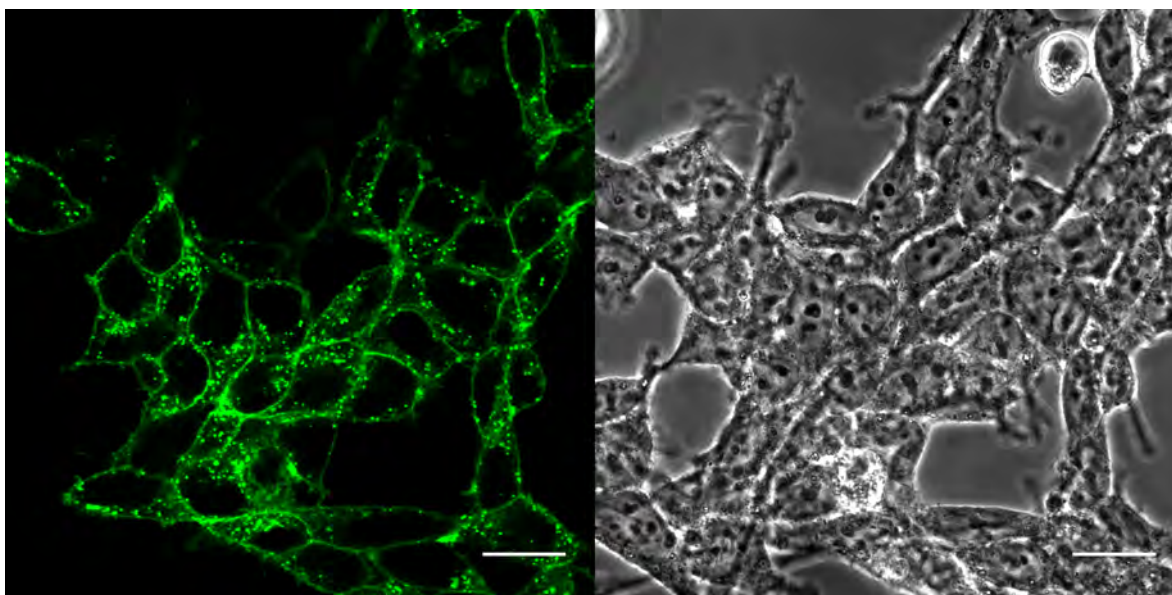


Figura 14. Microscopía de fluorescencia confocal de células HEK293 Flp-In T-REx estables expresando la construcción GPR120S-Venus. *Izquierda.* Células expresando la construcción del GPR120S-Venus después de un día de inducción con doxiciclina. *Derecha.* Mismo plano de la imagen de fluorescencia confocal en contraste de fases. Imagen representativa de 10 preparaciones diferentes de células. Barra = 20 μm

Después de comprobar la localización en membrana del receptor, se realizaron curvas de dosis-respuesta de incremento de calcio intracelular en esta línea celular con dos agonistas conocidos del receptor GPR120, el DHA y el α -LA (Figura 15). Como era esperado, la estimulación con los dos agonistas generó un incremento del calcio intracelular. La amplitud así como la velocidad de este incremento fue dosis dependiente.

Observamos el efecto máximo a una concentración de DHA 1 μM , mientras que con $\alpha\text{-LA}$ se requiere una concentración de 10 μM para alcanzar el efecto máximo. Con estos ensayos de calcio intracelular confirmamos la funcionalidad de la construcción GPR120S-Venus.

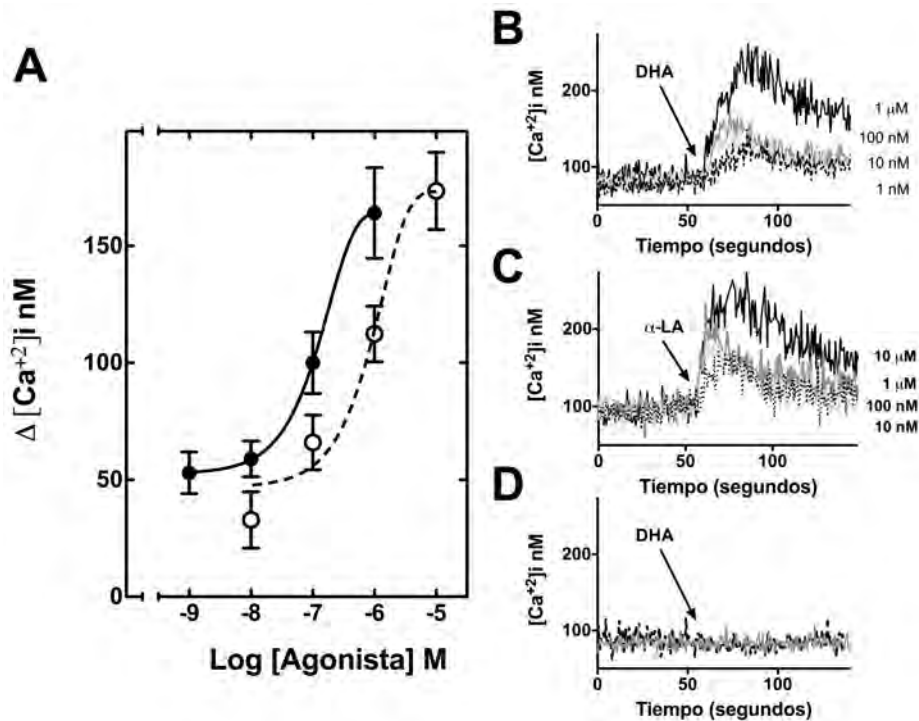


Figura 15. Efecto del DHA y el $\alpha\text{-LA}$ en la concentración de calcio intracelular. **A.** Incremento de la concentración de calcio intracelular ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) en células estimuladas con las concentraciones indicadas de DHA (círculos negros) o $\alpha\text{-LA}$ (círculos blancos). Se grafican las medias y las líneas verticales representan el error estándar medio (S.E.M) de 5 a 6 determinaciones. **B y C.** Trazos representativos de incremento de calcio intracelular generado por DHA y $\alpha\text{-LA}$. La flecha indica el momento de la estimulación con el ácido graso. Las concentraciones utilizadas se indican a la derecha. **D.** Ausencia de efecto de DHA 1 μM en células expresando la proteína Venus libre (línea continua) y en células GPR120-Venus no inducidas (línea punteada).

Posteriormente realizamos experimentos de fosforilación. Iniciamos con curvas dosis-respuesta en las que se observó que el receptor GPR120 se fosforila de forma dosis dependiente después de su activación por DHA y $\alpha\text{-LA}$. Así mismo, realizamos cursos temporales de fosforilación con los agonistas a concentraciones que generaban la máxima

fosforilación del receptor (Figura 16). En estos experimentos observamos que la máxima fosforilación se alcanzaba después de 5 min de estímulo y que la fosforilación disminuía a medida que pasaba el tiempo, pero no regresaba a su estado basal después de 60 minutos de estímulo. Notamos también que el receptor se encuentra fosforilado de forma basal.

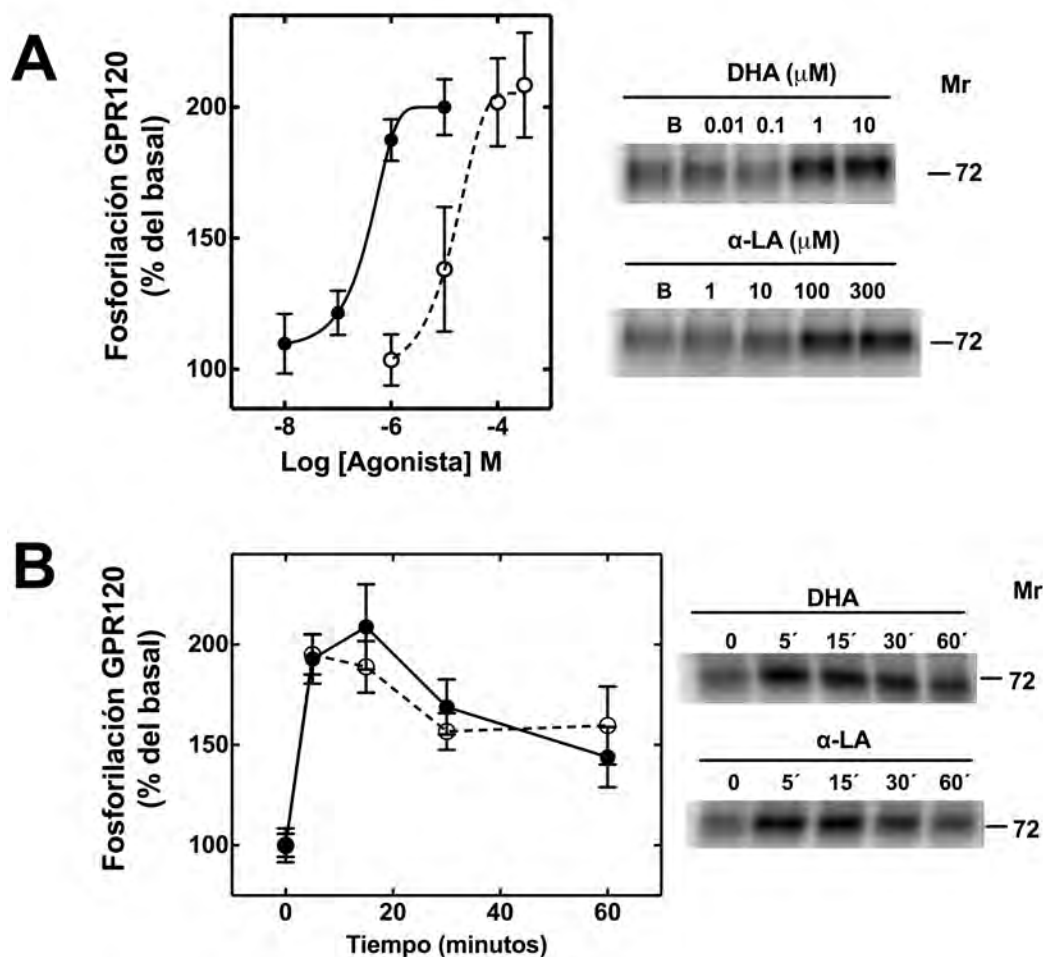


Figura 16. Efecto del DHA y el α -LA en la fosforilación del GPR120. **A.** Células estimuladas con la concentración indicada de DHA (círculos negros) o α -LA (círculos blancos) por 5 min. **B.** Células estimuladas a los tiempos indicados con DHA 1 μ M (círculos negros) o α -LA 100 μ M (círculos blancos). Se grafican las medias y las líneas verticales representan el error estándar medio (S.E.M) de 4 a 6 determinaciones. Se muestran autorradiografías representativas; B, basal.

Posteriormente, observamos que el receptor se fosforila después de la adición del éster de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) de forma dependiente de la concentración. La fosforilación dependiente de PMA tuvo una cinética ligeramente distinta a la cinética de fosforilación generada por los agonistas. Una vez que notamos que el receptor se fosforilaba por la estimulación por PMA decidimos evaluar la capacidad de respuesta del mismo. Realizamos experimentos de determinación de $[Ca^{+2}]_i$ en los que las células se incubaron previamente por 15 min con PMA 1 μ M. Estos experimentos muestran que la respuesta del receptor por los agonistas no se abate por el tratamiento previo con éster de forbol (Figura 17). Esto no es lo esperado porque el PMA es capaz de generar una fosforilación máxima del receptor después de 15 min. En trabajos previos del laboratorio se ha observado que otros GPCRs que son fosforilados por PKC son desensibilizados después de 15 minutos de la estimulación con PMA.

Como control de los experimentos de fosforilación se realizaron Western blots de las muestras para determinar la cantidad de receptor inmunoprecipitado en cada una de las condiciones de los experimentos (Figura 18). En estos experimentos observamos la misma cantidad de receptor en todas las condiciones. Notamos una banda muy intensa de aproximadamente 140 kDa, que se observa también en la fosforilación, que puede corresponder a agregados del receptor.

Adicionalmente realizamos experimentos control para confirmar que la proteína Venus sola no se fosforila bajo las condiciones de los experimentos (Figura 19). En el Western blot se observa la proteína Venus sola en los tres primeros carriles como una banda

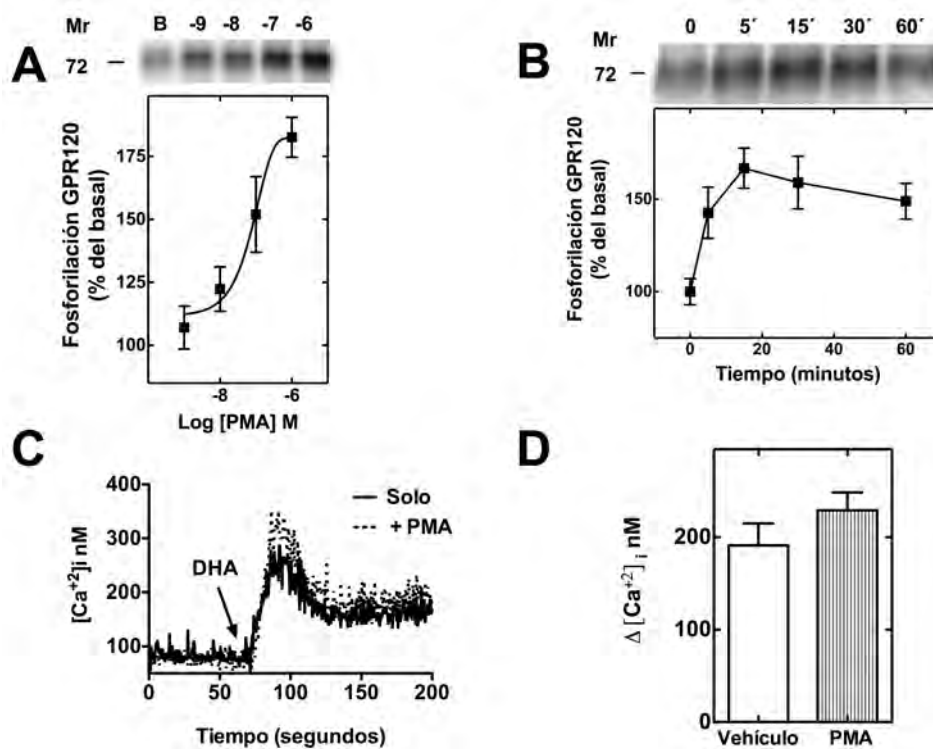


Figura 17. El PMA induce la fosforilación del GPR120 pero no su desensibilización. **A** y **B.** Fosforilación del GPR120 en células incubadas a las concentraciones indicadas de PMA por 15 min, **A**, y células incubadas con PMA 1 μ M por los tiempos indicados, **B**. Se grafican las medias y las líneas verticales representan el error estándar medio (S.E.M) de 4 a 5 determinaciones. Se muestran autorradiografías representativas; B, basal. **C.** Trazos representativos de incremento de calcio intracelular generado por DHA 1 μ M en células incubadas previamente por 15 min con vehículo o PMA 1 μ M. La flecha indica el tiempo de la adición del DHA. **D.** Incremento de la concentración de calcio intracelular inducida por DHA 1 μ M en células incubadas previamente por 15 min con vehículo o PMA 1 μ M. Se grafican las medias y las líneas verticales representan el error estándar medio (S.E.M) de 5 determinaciones.

intensa arriba de la banda de las cadenas ligeras de las IgGs. Por otro lado, la construcción GPR120-Venus se observa como una banda de aproximadamente 75 kDa, y los agregados de la construcción como una banda de aproximadamente 130 kDa. Como era de esperarse, las muestras de las células que expresan la proteína Venus sola no muestran marcaje

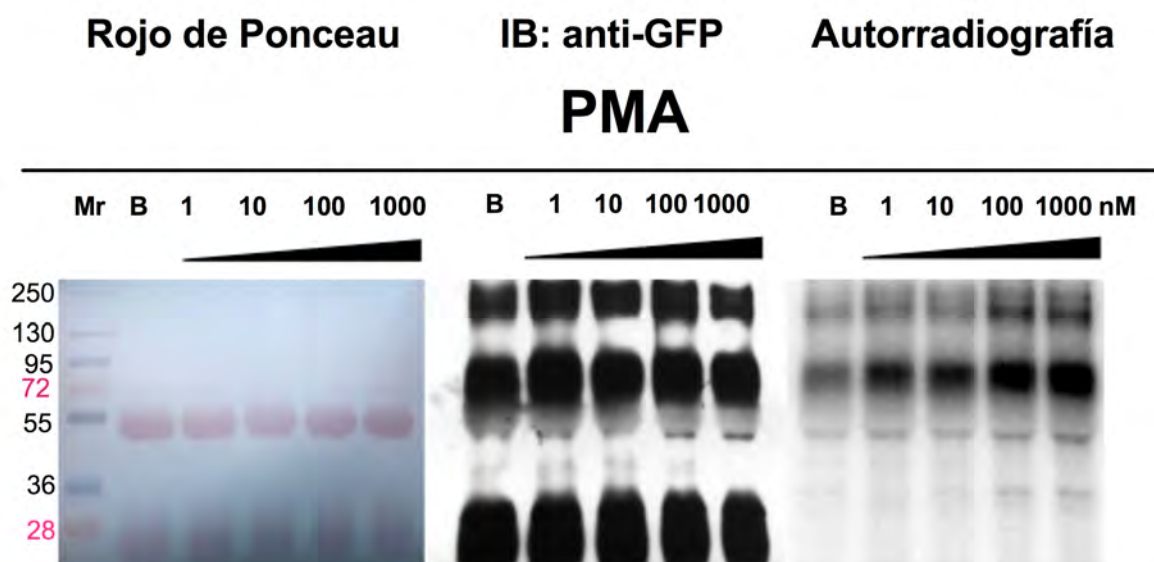


Figura 18. Experimento representativo de fosforilación. Células incubadas en presencia de vehículo (B, basal) o de PMA a las concentraciones indicadas por 15 minutos. *Izquierda.* Tinción de Rojo de Ponceau de la membrana utilizada para el Western blot y la autorradiografía de la derecha. Los pesos moleculares se corrieron en el primer carril de la izquierda. Las dos bandas gruesas presentes en el resto de los carriles corresponden a las cadenas pesadas y ligeras de las IgGs utilizadas para inmunoprecipitar al receptor GPR120S-Venus. *En medio.* Western blot utilizando anti-GFP comercial como anticuerpo primario y anti-cadenas ligeras de IgGs como anticuerpo secundario. La cadena ligera de las IgGs es detectada así como dos bandas gruesas de $\approx 70-75$ kDa y $\approx 140-220$ kDa. *Derecha.* Autorradiografía donde se observa una banda muy marcada radioactivamente de $\approx 70-75$. El efecto dependiente de la concentración de PMA se nota claramente. Se observan otras bandas en la región de $\approx 140-220$ kDa. Imagen representativa de al menos 4 experimentos con preparaciones de células distintas.

isotópico. En los carriles de las células que expresan la construcción GPR120-Venus se observa el receptor fosforilado de forma basal e hiperfosforilado después de los estímulos.

Tomando en cuenta que el PMA induce la fosforilación del GPR120, decidimos evaluar la participación de la proteína cinasa C en ambos tipos de fosforilaciones, la dependiente de agonistas y la dependiente del éster de forbol. Utilizamos los siguientes inhibidores selectivos de isoformas de PKC: Gö6976, selectivo para PKC α y β I, hispidina, selectivo para PKC β I y PKC β II, Rottlerina, selectivo para PKC δ y bisindolmaleimida I,

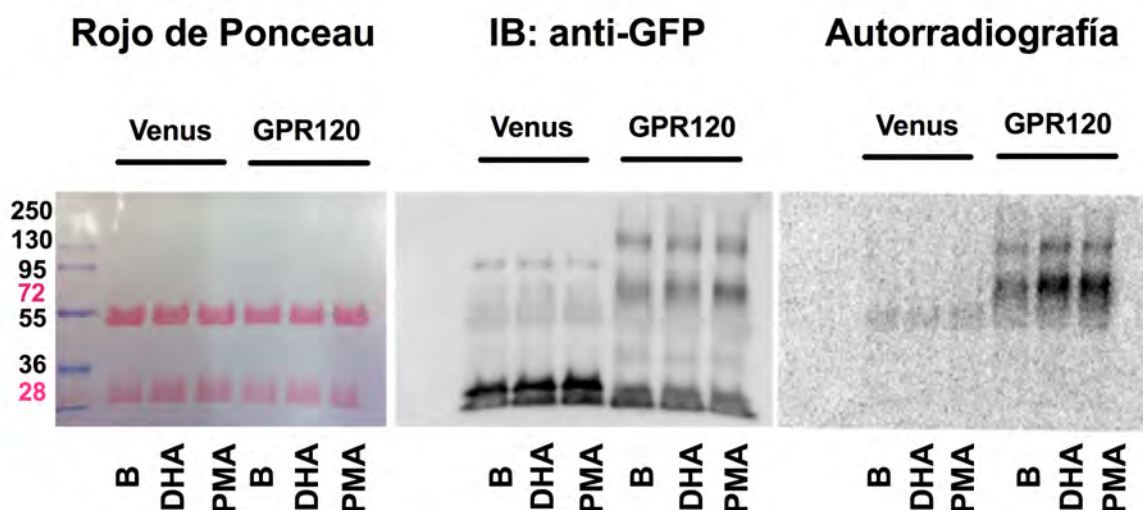


Figura 19. Experimento control de fosforilación de Venus representativo. Se incubaron células expresando la proteína libre Venus o la construcción GPR120-Venus en la ausencia de cualquier agente (B; basal) o en la presencia de DHA 1 μ M o PMA 1 μ M por 15 min. Las indicaciones de la figura son las mismas que las de la Figura 19. La detección de la reacción de quimioluminiscencia se llevó a cabo por un tiempo muy corto para definir mejor la proteína Venus (\approx 27 kDa) que migra muy cerca de las cadenas ligeras de las IgG durante la electroforesis.

inhibidor general de PKC. Al utilizar estos inhibidores observamos que la presencia de Gö 6976 y bisindolmaleimida 1 bloqueó la fosforilación generada por el estímulo con PMA, no así la generada por el estímulo con DHA (Figura 20). Esto sugiere que las isoformas clásicas de PKC, muy probablemente PKC α , tienen una participación importante en la fosforilación mediada por PMA. Sin embargo, la fosforilación generada por DHA no se ve afectada por los inhibidores, lo que sugiere que otras cinasas están involucradas en este mecanismo, probablemente GRKs.

Adicionalmente se realizaron experimentos incubando a las células en presencia de DHA y PMA como una forma de evaluar si los residuos fosforilados o las cinasas participantes en la fosforilación por agonistas se comparten en la fosforilación por PMA

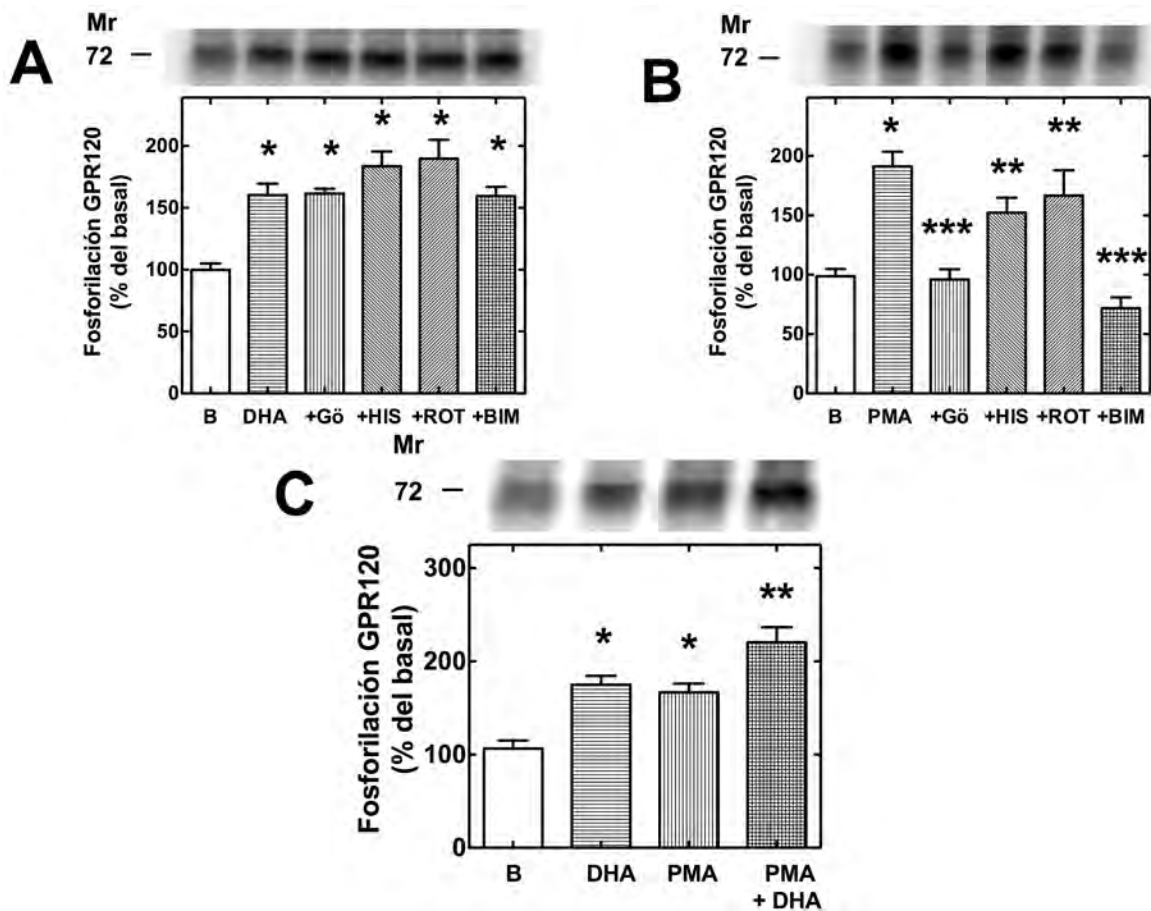


Figura 20. Efecto de los inhibidores de proteína cinasa C sobre la fosforilación del GPR120 inducida por DHA y PMA. **A.** Fosforilación del receptor en células incubadas por 15 minutos en la presencia o ausencia de 1 μ M de inhibidor (Gö: Gö6976; HIS: hispidina; ROT: rottlerina o BIM: bisindoilmaleimida I) seguida de una incubación de 5 minutos en la ausencia (B, basal) o presencia de DHA 1 μ M. Se grafican las medias y las líneas verticales representan el error estándar medio (S.E.M) de 5 determinaciones. * $p < 0.005$ vs basal (B). **B.** Fosforilación del receptor en células incubadas por 15 min en presencia o ausencia de 1 μ M de los inhibidores mencionados en ausencia (B, basal) o presencia de PMA 1 μ M. Se grafican las medias y las líneas verticales representan el error estándar medio (S.E.M) de 5 determinaciones. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.01$ vs basal; *** $p < 0.01$ vs PMA sin inhibidor. **C.** Fosforilación del receptor en células incubadas en la ausencia (B, basal) o presencia de DHA 1 μ M por 5 min o PMA 1 μ M por 15 minutos; cuando los dos agentes están presentes el tiempo de incubación inicio con la adición de PMA y el DHA fue adicionado en los últimos 5 min (15 min en total). Se grafican las medias y las líneas verticales representan el error estándar medio (S.E.M) de 6-7 determinaciones. * $p < 0.005$ vs basal (B), ** $p < 0.001$ vs basal (B) y $p < 0.005$ vs DHA o PMA solos. Se muestran autorradiografías representativas.

(Figura 20). En estos experimentos notamos que la fosforilación del receptor generada por PMA más DHA es mayor que la fosforilación generada por cada uno de los agentes solos. Estos resultados apoyan la noción de que los mecanismos de fosforilación son distintos, que en estos mecanismos están involucradas cinasas distintas y/o sitios distintos de fosforilación dentro del receptor.

Como control de la especificidad de inhibición de estos agentes, se realizaron experimentos de fosforilación donde se incubaron las células con los inhibidores solos. Se utilizó como control positivo de estos experimentos DHA 1 μ M (Figura 21). Estos experimentos mostraron que la mayoría de los inhibidores solos no generan un cambio significativo en la fosforilación basal del receptor. Cabe destacar que BIM I si disminuye la fosforilación basal del receptor. Esto indica que las isoformas de PKC que son inhibidas por BIM I, pero no por Gö 6976 participan en la fosforilación basal del receptor.

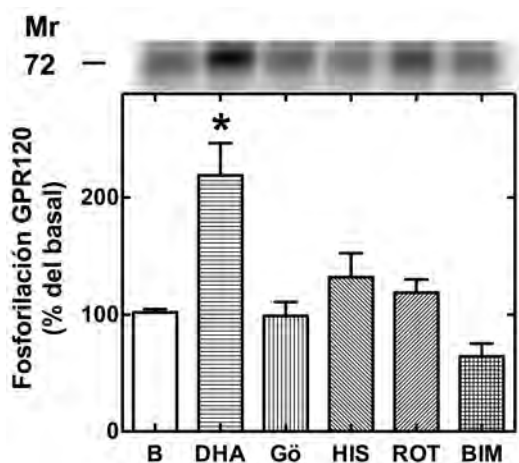


Figura 21. Efecto de los inhibidores de proteína cinasa C sobre la fosforilación basal del GPR120. Fosforilación del receptor en células incubadas por 15 minutos en la presencia o ausencia de 1 μ M de inhibidores (Gö, Gö 6976, HIS, hispidina, ROTT, rottlerina o BIM, bisindolmaleimida I) seguida de una incubación de 5 min en la presencia de vehículo; una muestra fue incubada durante este último periodo con DHA 1 μ M (control positivo). Se grafican las medias y las líneas verticales representan el error estándar medio (S.E.M) de 5 determinaciones. * $p < 0.001$ vs basal (B). Se muestra una autorradiografía representativa.

Para definir si los estímulos generaban la internalización del receptor se analizó la localización del receptor utilizando microscopia confocal (Figura 22) y microscopia de TIRF (Figura 23) después de los estímulos con DHA y PMA. El microscopio confocal nos permitió ver que el receptor desaparece completamente de la membrana después de 15 min del estímulo con DHA 1 μM y no regresa a ella después de 30 min. Después de este estímulo el receptor se encuentra altamente endocitado. Utilizamos el incremento de la fluorescencia intracelular para realizar un análisis cuantitativo para evaluar el incremento de la cantidad de receptor internalizado. Después de 15 minutos de estímulo con PMA 1 μM el receptor aún se encuentra en la membrana pero incrementa el número de vesículas que lo contienen. Después de 30 minutos de estímulo con PMA la cantidad de receptor endocitado incrementa hasta casi alcanzar la cantidad de receptor internalizado por el estímulo de DHA después de 15 min. Cuando se estimularon las células con los dos agentes al mismo tiempo el receptor se endocitó en mayor cantidad a los 15 minutos que en cada uno de los tratamientos, pero el efecto parece no ser aditivo (Figura 22).

La microscopia de TIRF tiene la capacidad de detectar solamente la fluorescencia que se encuentra muy cerca de la membrana celular que está en contacto con el vidrio de la preparación. Esta capacidad se da porque el microscopio de TIRF genera una onda evanescente para excitar los fluoróforos de la muestra. La onda evanescente que se genera al hacer incidir el láser de excitación en un ángulo crítico sobre el vidrio penetra en la muestra aproximadamente 200 nm. Tomando en cuenta el grosor de la membrana

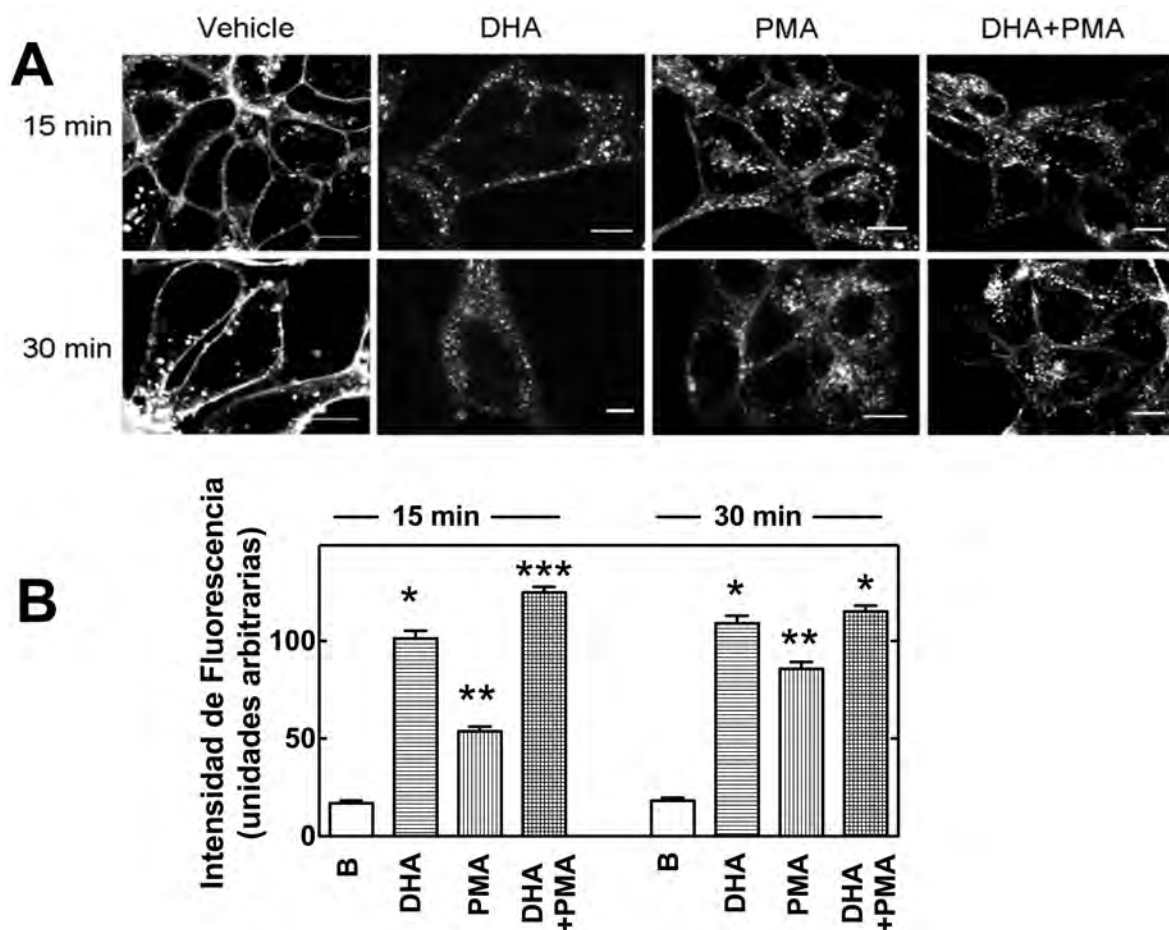


Figura 22. Efecto del DHA y PMA en la internalización del GPR120. **A:** Imágenes de microscopio confocal representativas de células incubadas por 15 y 30 min con DMSO (vehículo), DHA 1 μ M, PMA 1 μ M o DHA 1 μ M más PMA 1 μ M. Barra = 10 μ m. **B.** Cuantificación de la fluorescencia intracelular (internalización de GPR120-Venus). Imágenes con 15 a 20 células se obtuvieron y las áreas que corresponden al citoplasma fueron seleccionadas y la cantidad de fluorescencia cuantificada. Se grafican las medias con los S.E.M. representados en líneas verticales de 80-100 determinaciones individuales (fluorescencia citoplasma) usando diferentes preparaciones de células. *P < 0.001 vs. basal (B), **P < 0.001 vs. todos los otros tratamientos con el mismo tiempo de incubación y ***P < 0.001 vs. todos los otros tratamientos con el mismo tiempo de incubación. Imágenes representativas de múltiples observaciones usando por lo menos 3 preparaciones de células diferentes.

plasmática de aproximadamente 10 nm, podemos decir que estamos detectando la fluorescencia en la membrana y/o la fluorescencia muy cercana a ella.

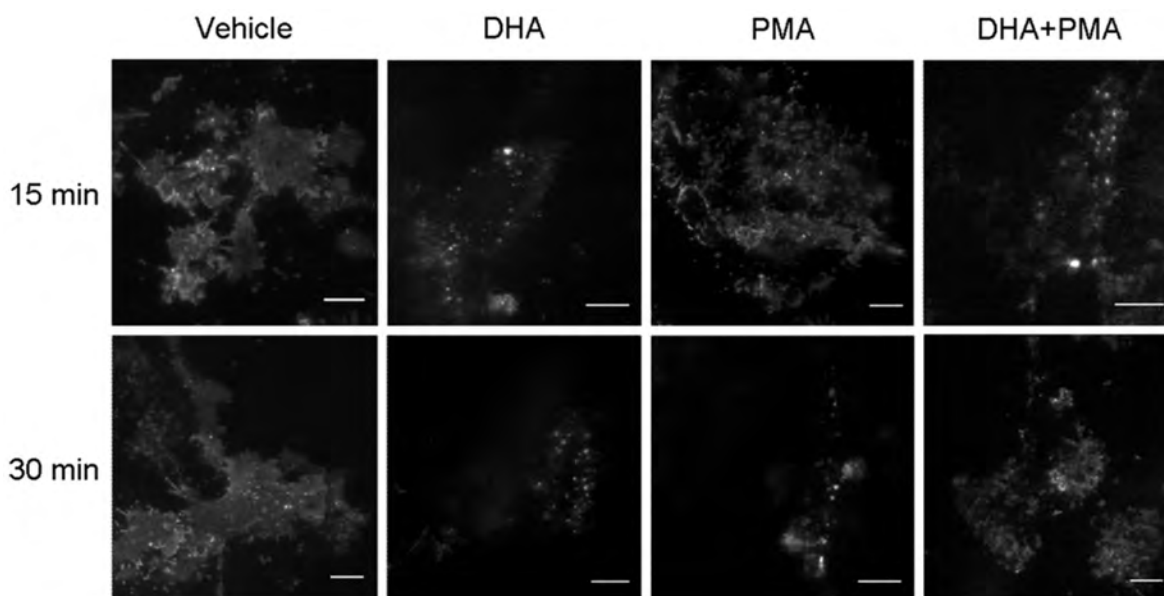


Figura 23. Imágenes de microscopía de TIRF (fluorescencia interna total reflejada) que muestran el efecto de DHA y PMA en la internalización del GPR120. Imágenes de TIRF de células incubadas por 15 o 30 min con DMSO (vehículo), DHA 1 μ M, PMA 1 μ M o DHA 1 μ M más PMA 1 μ M. Barra = 10 μ m. Imágenes representativas de múltiples observaciones usando por lo menos 3 preparaciones de células diferentes.

Las imágenes de TIRF comprobaron lo que observamos con el microscopio confocal. Observamos que el receptor se encuentra en la membrana de forma basal y no modifica su localización después de 30 minutos de la adición del vehículo. En la imágenes del vehículo se puede observar el contacto que hace la célula con el vidrio de la preparación y que en la membrana que hace contacto está el receptor, así como en la cercanía. Las imágenes del estímulo con DHA muestran que el receptor desaparece de la membrana celular y se encuentra endocitado. Se pueden observar vesículas de gran tamaño que probablemente sean endosomas que contienen al receptor que se encontraba previamente en la membrana. En el estímulo con PMA también se observa que el receptor en membrana disminuye después 15 min, pero la membrana aún es visible. Posterior a los 30 min de

estímulo con PMA ya no se observa la membrana y se observan endosomas similares a los de la imagen del estímulo con DHA. Finalmente al utilizar los dos agentes observamos un comportamiento similar al estímulo con DHA, a los 15 minutos se observan endosomas con una alta señal de fluorescencia (Figura 23).

9. Discusión

Existe un gran interés por definir la regulación del receptor GPR120 debido a su gran potencial como blanco terapéutico en cuadros clínicos como obesidad y Diabetes Mellitus tipo 2. En trabajos previos se ha demostrado que este receptor se acopla a proteína G_q (33) y que la fosforilación basal y la generada por DHA y α -LA a diversos tiempos es diferente para cada una de las variantes de splicing del receptor (68). Sin embargo, se sabe poco sobre las cinasas involucradas y los residuos de amino ácidos donde ocurre la fosforilación.

Nuestros datos indican que el receptor GPR120 es una proteína fosforilada de forma basal que sufre cambios en su estado de fosforilación por la acción de sus agonistas: DHA y α -LA. Además modifica su estado de fosforilación por la activación directa de la proteína cinasa C por el éster de forbol PMA. Al inmunoprecipitar el receptor se puede observar una banda muy marcada de ≈ 70 -75 kDa que corresponde a la construcción del receptor (el GPR120 pesa ≈ 42 kDa más la proteína Venus de ≈ 27 kDa). La presencia de bandas de mayor peso molecular que cambian su estado de fosforilación por la acción de los agonistas y por el PMA puede ser explicada por la presencia de complejos proteicos con el receptor, modificaciones post-traduccionales, homodímeros o heterodímeros con otros receptores. El uso de otras metodología es necesario para definir a que se debe la presencia de esta banda de mayor peso molecular.

Las curvas dosis-respuesta de calcio intracelular y de fosforilación de los agonistas muestran una diferencia de aproximadamente un orden de magnitud. Esto indica una poza

relativamente grande de receptores que es lo esperado para un sistema en el que se sobreexpresa el receptor. Al parecer es necesario que muchos de los receptores estén ocupados para inducir la fosforilación de los mismos.

La fosforilación generada por el éster de forbol sugiere que la PKC está involucrada en la fosforilación del receptor. Los experimentos con los inhibidores de las isoformas de PKC: bisindolmaleimida 1 (no selectivo de isoformas PKC), Gö6976 (selectivo de isoforma α de PKC), hispidina (selectivo de isoformas β I y β II de PKC) y rottlerina (selectivo de isoforma δ de PKC), confirman el papel de la PKC en la fosforilación dependiente de PMA. El efecto de Gö6976 sugiere una participación importante de las isoformas convencionales de PKC. Estos experimentos también indican que la PKC tiene poca participación en la fosforilación mediada por agonistas; probablemente la fosforilación mediada por agonistas se lleva a cabo en su mayoría por GRKs u otras enzimas.

Los experimentos en los que se determinó el calcio intracelular muestran que la incubación previa con PMA no abate el incremento de calcio generado por los agonistas. Mientras que en los experimentos de internalización, se observa que el PMA es capaz de internalizar al receptor en menor medida que el agonista DHA. Al parecer las cinasas y probablemente los sitios de fosforilación del GPR120 medida por agonistas y por PMA son diferentes. En los experimentos donde se estimulan las células con los dos agentes la fosforilación del receptor es mayor que cualquiera de los agentes solos. Una explicación a este fenómeno es la posibilidad de que dentro de los residuos de aminoácidos fosforilados

algunos se comparten y otros no. Al parecer la fosforilación mediada por PKC no tiene como finalidad la desensibilización del receptor; es muy probable que el receptor se fosfore a través de mecanismos diferentes y esto genera consecuencias fisiológicas distintas.

Es posible caracterizar los sitios de fosforilación para ayudar a definir la función de la fosforilación de los mismos. Si se conocen los sitios fosforilados por cada uno de los estímulos se pueden generar receptores mutantes. Los receptores mutantes ayudarían a definir el papel de la fosforilación por PMA, y con esto caracterizar mas a fondo los mecanismos involucrados en la regulación de este blanco farmacológico prometedor.

10. Conclusion

Nuestros datos indican que el receptor GPR120 es una proteína fosforilada que incrementa su estado de fosforilación por la acción de los agonistas y por la activación de la PKC. Al parecer la PKC no tiene participación en la fosforilación del receptor mediada por agonistas, mientras que las isoformas convencionales de PKC tienen un papel importante en la fosforilación inducida por PMA. Esto sugiere, que la PKC es un regulador importante de la función del receptor, sin embargo, la acción de la PKC no induce la desensibilización del receptor. Definir la función real de la fosforilación PKC en este receptor puede ayudar a conocer efectos funcionales de la fosforilación de GPCRs distintos a la desensibilización.

El presente trabajo se publicó en el *European Journal of Pharmacology*, esta publicación se encuentra anexada al final de este documento.

11. Referencias

1. Coppack, S. W., Jensen, M. D., and Miles, J. M. (2002) *In vivo* regulation of lipolysis in human. *J. Lipid Res.*, 1–17
2. Armoni, M., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Milo, S., and Karnieli, E. (2005) Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements. *J. Biol. Chem.* 280, 34786–34795
3. Shimano, H. (2009) SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS. J.* 276, 616–621
4. Kaemmerer, E. (2010) Fatty acid binding receptors in intestinal physiology and pathophysiology. *World. J. Gastrointest. Pathophysiol.* 1, 147
5. Meyer, B. J., Mann, N. J., Lewis, J. L., Milligan, G. C., Sinclair, A. J., and Howe, P. R. C. (2003) Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 38, 391–398
6. Calder, P. C. (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 645–662
7. Alexander, S. P. H., Mathie, A., and Peters, J. A. (2011) Guide to receptors and channels (GRAC), 5th edition. *Brit. J. Pharmacol.* 164 Suppl 1, S1–324
8. Oldham, W. M., and Hamm, H. E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature* 9, 60–71

9. Heck, M., and Hofmann, K. P. (2001) Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *J. Biol. Chem.* 276, 10000–10009
10. Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., and Fagni, L. (2003) The “magic tail” of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS. Lett.* 546, 65–72
11. Milligan, G., and Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Brit. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S46–55
12. Salon, J. A., Lodowski, D. T., and Palczewski, K. (2011) The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63, 901–937
13. Jastrzebska, B., Tsybovsky, Y., and Palczewski, K. (2010) Complexes between photoactivated rhodopsin and transducin: progress and questions. *Biochem. J.* 428, 1–10
14. Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., and Tsujimoto, G. (2004) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* 11, 90–94
15. Overton, H. A., Babbs, A. J., Doel, S. M., Fyfe, M. C. T., Gardner, L. S., Griffin, G., Jackson, H. C., Procter, M. J., Rasamison, C. M., and Tang-Christensen, M. (2006) Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell. Metab.* 3, 167–175

16. Costanzi, S., Neumann, S., and Gershengorn, M. C. (2008) Seven transmembrane-spanning receptors for free fatty acids as therapeutic targets for Diabetes Mellitus: pharmacological, phylogenetic, and drug discovery aspects. *J. Biol. Chem.* 283, 16269–16273
17. Tikhonova, I. G., Sum, C. S., Neumann, S., Thomas, C. J., Raaka, B. M., Costanzi, S., and Gershengorn, M. C. (2007) Bidirectional, iterative approach to the structural delineation of the functional “chemoprint” in GPR40 for agonist recognition. *J. Med. Chem.* 50, 2981–2989
18. Briscoe, C. P., Tadayyon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., Ellis, C., Elshourbagy, N. A., Goetz, A. S., Minnick, D. T., Murdock, P. R., Sauls, H. R., Shabon, U., Spinage, L. D., Strum, J. C., Szekeres, P. G., Tan, K. B., Way, J. M., Ignar, D. M., Wilson, S., and Muir, A. I. (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11303–11311
19. Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Himuna, S., Fujisawa, Y., and Fujino, M. (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cell through GPR40. *Nature.* 1–4

20. Kotarsky, K., Nilsson, N. E., Flodgren, E., Owman, C., and Olde, B. (2003) A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 406–410
21. Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., Pike, N. B., Strum, J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall, F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., Foord, S. M., Wise, A., and Dowell, S. J. (2003) The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11312–11319
22. Le Poul, E. (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* 278, 25481–25489
23. Nilsson, N. E., Kotarsky, K., Owman, C., and Olde, B. (2003) Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 1047–1052
24. Yonezawa, T., Katoh, K., and Obara, Y. (2004) Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 805–809
25. Edfalk, S., Steneberg, P., and Edlund, H. (2008) Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 57, 2280–2287

26. Ma, D., Tao, B., Warashina, S., Kotani, S., Lu, L., Kaplamadzhiev, D. B., Mori, Y., Tonchev, A. B., and Yamashima, T. (2007) Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the central nervous system of adult monkeys. *Neurosci. Res.* 58, 394–401
27. Senga, T. (2002) LSSIG is a novel murine leukocyte-specific GPCR that is induced by the activation of STAT3. *Blood* 101, 1185–1187
28. Hong, Y. H. (2005) Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* 146, 5092–5099
29. Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S.-I., and Kuwahara, A. (2008) Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J. Physiol. Pharmacol.* 59, 251–262
30. Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Di Yu, Schilter, H. C., Rolph, M. S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M., and Mackay, C. R. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 461, 1282–1286
31. Tazoe, H., Otomo, Y., Karaki, S.-I., Kato, I., Fukami, Y., Terasaki, M., and Kuwahara, A. (2009) Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed. Res.* 1–8
32. Da Young Oh, Talukdar, S., Bae, E. J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W. J., Watkins, S. M., and Olefsky, J. M. (2010) GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687–698

33. Tanaka, T., Yano, T., Adachi, T., Koshimizu, T.-A., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2008) Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: *in vivo* effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic β cells. *N-S. Arch. Pharmacol.* 377, 515–522
34. Ichimura, A., Hirasawa, A., Hara, T., and Tsujimoto, G. (2009) Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostag. Oth. Lipid. M.* 89, 82–88
35. Hotamisligil, G. S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 444, 860–867
36. Shoelson, S. E., and Goldfine, A. B. (2009) Fanning the flames of obesity-induced inflammation. *Nature.* 15, 373–374
37. Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z.-W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J. M., and Karin, M. (2005) IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 11, 1–8
38. Chiang, S.-H., Bazuine, M., Lumeng, C. N., Geletka, L. M., Mowers, J., White, N. M., Ma, J.-T., Zhou, J., Qi, N., Westcott, D., Delproposto, J. B., Blackwell, T. S., Yull, F. E., and Saltiel, A. R. (2009) The protein kinase IKK ϵ regulates energy balance in obese mice. *Cell.* 138, 961–975
39. Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J. G., Bandyopadhyay, G. K., Luo, J.-L., Naugler, W., Grivennikov, S., Wynshaw-Boris, A., Scadeng, M., Olefsky, J. M., and Karin, M. (2007) JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced

- inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metabol.* 6, 386–397
40. Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J. S. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015–3025
41. Serhan, C. N., Chiang, N., and Van Dyke, T. E. (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 349–361
42. Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., Gerard, C., and Lefkowitz, R. J. (2010) β -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *P. Natl. Acad. Sci.* 107, 628–632
43. Saltiel, A. R. (2010) Fishing out a sensor for anti-inflammatory oils. *Cell.* 142, 672–674
44. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117, 175–184
45. Moore, K., Zhang, Q., Murgolo, N., Hosted, T., and Duffy, R. (2009) Cloning, expression, and pharmacological characterization of the GPR120 free fatty acid receptor from cynomolgus monkey: comparison with human GPR120 splice variants. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 154, 419–426
46. Gurevich, V. V., and Gurevich, E. V. (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 110, 465–502

47. Watson, S. J., Brown, A. J. H., and Holliday, N. D. (2012) Differential signaling by splice variants of the human free fatty acid receptor GPR120. *Mol. Pharmacol.* 81, 631–642
48. Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Leloire, A., Liu, N., Iida, K., Choquet, H., Besnard, P., Lecoœur, C., Vivequin, S., Ayukawa, K., Takeuchi, M., Ozawa, K., Tauber, M., Maffei, C., Morandi, A., Buzzetti, R., Elliott, P., Pouta, A., Jarvelin, M.-R., Körner, A., Kiess, W., Pigeyre, M., Caiazzo, R., Van Hul, W., Van Gaal, L., Horber, F., Balkau, B., Lévy-Marchal, C., Rouskas, K., Kouvatsi, A., Hebebrand, J., Hinney, A., Scherag, A., Pattou, F., Meyre, D., Koshimizu, T.-A., Wolowczuk, I., Tsujimoto, G., and Froguel, P. (2012) Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature.* 483, 350–357
49. Da Young Oh, and Olefsky, J. M. (2012) Omega 3 fatty acids and GPR120. *Cell Metabol.* 15, 564–565
50. Mellor, H., and Parker, P. J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332 (Pt 2), 281–292
51. Leitges, M. (2007) Functional PKC *in vivo* analysis using deficient mouse models. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1018–1020
52. Oancea, E., and Meyer, T. (1998) Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell.* 95, 307–318

53. Jaken, S., and Parker, P. J. (2000) Protein kinase C binding partners. *Bioessays*. 22, 245–254
54. Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M. F., and Alessi, D. R. (2004) PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15, 161–170
55. Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J. M., Boeckeler, K., and Parker, P. J. (2010) PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* 11, 103–112
56. Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., and Jacinto, E. (2008) The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* 27, 1932–1943
57. Grodsky, N., Li, Y., Bouzida, D., Love, R., Jensen, J., Nodes, B., Nonomiya, J., and Grant, S. (2006) Structure of the catalytic domain of human protein kinase C beta II complexed with a bisindolylmaleimide inhibitor. *Biochemistry* 45, 13970–13981
58. Delom, F., and Fessart, D. (2011) Role of phosphorylation in the control of clathrin-mediated internalization of GPCR. *Int. J. Cell. Biol.* 2011, 1–14
59. Krasel, C., Dammeier, S., Winstel, R., Brockmann, J., Mischak, H., and Lohse, M. J. (2001) Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J. Biol. Chem.* 276, 1911–1915

60. Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., Zastrow, von, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C. J., and Christie, M. J. (2013) Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization and tolerance. *Pharmacol. Rev.* 65, 223–254
61. Evron, T., Daigle, T. L., and Caron, M. G. (2012) GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends. Pharmacol. Sci.* 33, 154–164
62. Kelly, E., Bailey, C. P., and Henderson, G. (2009) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Brit. J. Pharmacol.* 153, S379–S388
63. Ward, R. J., Alvarez-Curto, E., and Milligan, G. (2011) Using the Flp-In™ T-Rex™ system to regulate GPCR expression. *Method. Mol. Biol.* 746, 21–37
64. Nagai, T., Iyata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2001) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20, 87–90
65. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (2001) New Generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 1–11
66. Colín-Santana, C. C., Avendaño-Vázquez, S. E., Alcántara-Hernández, R., and García-Sáinz, J. A. (2011) EGF and angiotensin II modulate lysophosphatidic acid LPA_1 receptor function and phosphorylation state. *Biochim. Biophys. Acta.* 1810, 1170–1177
67. Thomas, W. G. (2009) Immunoprecipitation and phosphorylation of G protein-coupled receptors. *Methods Mol. Biol.* 552, 359–371

68. Burns, R. N., and Moniri, N. H. (2010) Agonism with the omega-3 fatty acids α -linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 396, 1030–1035



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Molecular and cellular pharmacology

Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation

Omar B. Sánchez-Reyes^a, M. Teresa Romero-Ávila^a, Jean A. Castillo-Badillo^a, Yoshinori Takei^b, Akira Hirasawa^b, Gozoh Tsujimoto^b, Rafael Villalobos-Molina^c, J. Adolfo García-Sáinz^{a,*}^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-248, México D. F. 04510, Mexico^b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan^c Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2013

Received in revised form

4 November 2013

Accepted 6 November 2013

Keywords:

GPR120

Free fatty acid receptor 4

Receptor phosphorylation

Protein kinase C

ABSTRACT

GPR120, free fatty acid receptor 4, is a recently orphanized G protein-coupled receptor that seems to play cardinal roles in the regulation of metabolism and in the pathophysiology of inflammatory and metabolic disorders. In the present work a GPR120-Venus fusion protein was expressed in HEK293 Flp-In T-REx cells and its function (increase in intracellular calcium) and phosphorylation were studied. It was observed that the fusion protein migrated in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels as a band with a mass of ≈ 70 –75 kDa, although other bands of higher apparent weight (> 130 kDa) were also detected. Cell stimulation with docosahexaenoic acid or α -linolenic acid induced concentration-dependent increases in intracellular calcium and GPR120 phosphorylation. Activation of protein kinase C with phorbol esters also induced a marked receptor phosphorylation but did not alter the ability of 1 μ M docosahexaenoic acid to increase the intracellular calcium concentration. Phorbol ester-induced GPR120 phosphorylation, but not that induced with docosahexaenoic acid, was blocked by protein kinase C inhibitors (bis-indolyl-maleimide I and Gö 6976) suggesting that conventional kinase isoforms mediate this action. The absence of effect of protein kinase C inhibitors on agonist-induced GPR120 phosphorylation indicates that this kinase does not play a major role in agonist-induced receptor phosphorylation. Docosahexaenoic acid action was associated with marked GPR120 internalization whereas that induced with phorbol esters was smaller at early times.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Free fatty acids (FFAs) are important metabolic fuels and those that are polyunsaturated are essential components of the human diet. In addition to these metabolic roles, it is now clear that they are bioactive ligands for several types of receptors, including nuclear receptors, such as peroxisome proliferator-activated receptors, and a family of G protein-coupled receptors (GPCRs) (Chawla et al., 2001; Hirasawa et al., 2008; Stoddart et al., 2008). Four GPCRs have been orphanized/identified as FFA receptors: GPR40, GPR41, GPR43 (Stoddart et al., 2008) and, recently, GPR120 (Hirasawa et al., 2005). GPR40 (FFA receptor 1) and GPR120 (FFA receptor 4) are considered of particular interest because they appear to be involved in physiological and pathophysiological

processes related with metabolic disorders such as the so-called “metabolic syndrome” and type 2 diabetes mellitus (Hara et al., 2011). It has been observed that GPR120-deficient mice develop obesity, glucose intolerance, and fatty liver, and that a dysfunctional variant of GPR120 (R270H) is associated with obesity and other metabolic disturbances in humans (Ichimura et al., 2012). Additionally, this receptor mediates insulin-sensitizing and anti-inflammatory effects in cells (adipocytes and macrophages) and in whole organisms (mice) (Oh et al., 2010).

Two splice variants of GPR120 exist in humans, a long form of 361 residues and a short one (lacking 16 residues at the third intracellular loop) (Moore et al., 2009); the short receptor (but not the long one), couples to $G\alpha_q/11$ and activates calcium signaling, whereas both receptors interact with β -arrestin and internalize in response to agonists (Watson et al., 2012). It has also been reported that both variants forms are phosphorylated in response to agonists (Burns and Moniri, 2010).

In the present work we show that both, receptor stimulation with agonists, and activation of protein kinase C (PKC) resulted in strong receptor phosphorylation. The magnitude and time-course

Abbreviations: FFA, free fatty acid; GPCR, G protein-coupled receptor; PKC, protein kinase C; DHA, docosahexaenoic acid; α -LA, α -linolenic acid; TIRF, total internal reflection fluorescence

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 613.

E-mail address: agarcia@ifc.unam.mx (J.A. García-Sáinz).

0014-2999/\$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.003>

Please cite this article as: Sánchez-Reyes, O.B., et al., Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation. Eur J Pharmacol (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.003>

of these effects were similar, but showed some differences. PKC activation with phorbol esters, did not induce receptor desensitization but increased GPR120 internalization. PKC inhibitors block phorbol ester-induced GPR120 phosphorylation but not that due to agonist action; some of these data were presented in an international meeting (Sánchez-Reyes et al., 2013).

2. Materials and methods

2.1. Materials and cell lines

The sources of materials were the same published previously (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Castillo-Badillo et al., 2012; Hara et al., 2009; Hirasawa et al., 2005). An anti-GFP rabbit antiserum generated in our laboratory (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Castillo-Badillo et al., 2012) (Venus is a variant of yellow fluorescent protein that cross-reacts with this antiserum) was used for receptor immunoprecipitation and immunoblotting; similar results were obtained using a commercial anti-GFP polyclonal antibody obtained from Clontech. Plasmids for the expression of a carboxyl-terminus Venus-tagged short variant of human GPR120 and the free Venus protein were prepared as described previously (Hara et al., 2009; Hirasawa et al., 2005). Flp-In T-REx 293 cells were utilized to develop stable cell lines, which were subjected to selection in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 µg/ml blasticidin S and 100 µg/ml hygromycin B. Cells were cultured in this medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 µg/ml amphotericin B at 37 °C under a 95%

air/5% CO₂ atmosphere. Venus or GPR120-Venus protein expression was induced by adding doxycycline hyclate 1 µg/ml, 24–36 h prior to performance of the experiments and was confirmed by epifluorescence microscopy. Uninduced GPR120-Venus cells and cells expressing the free Venus protein were used as controls (Hara et al., 2009; Hirasawa et al., 2005) (Supplementary Fig. S1).

2.2. Intracellular calcium determinations

Intracellular calcium was determined as previously described (Castillo-Badillo et al., 2012). Briefly, cells were serum-starved for 2 h, loaded with 2.5 µM Fura-2/AM for 1 h at 37 °C, and immediately washed to eliminate unincorporated dye. Fluorescence measurements were carried out at 340- and 380-nm excitation, and at 510-nm emission wavelengths; chopper interval was set at 0.5 s. Intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) was calculated according to Grynkiewicz et al. (1985).

2.3. Receptor phosphorylation

Receptor phosphorylation was studied employing a procedure described to study other receptors fused to the green fluorescent protein (GFP) (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Castillo-Badillo et al., 2012). Briefly, cells were incubated in 1 ml of phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing [³²P]Pi (100 µCi/ml) for 3 h at 37 °C. Labeled cells were stimulated as indicated, washed with ice-cold phosphate-buffered saline, and solubilized in detergent-containing buffer (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Castillo-Badillo et al., 2012). Samples were centrifuged at 12,700 × g for 15 min at 4 °C and supernatants were incubated overnight at 4 °C

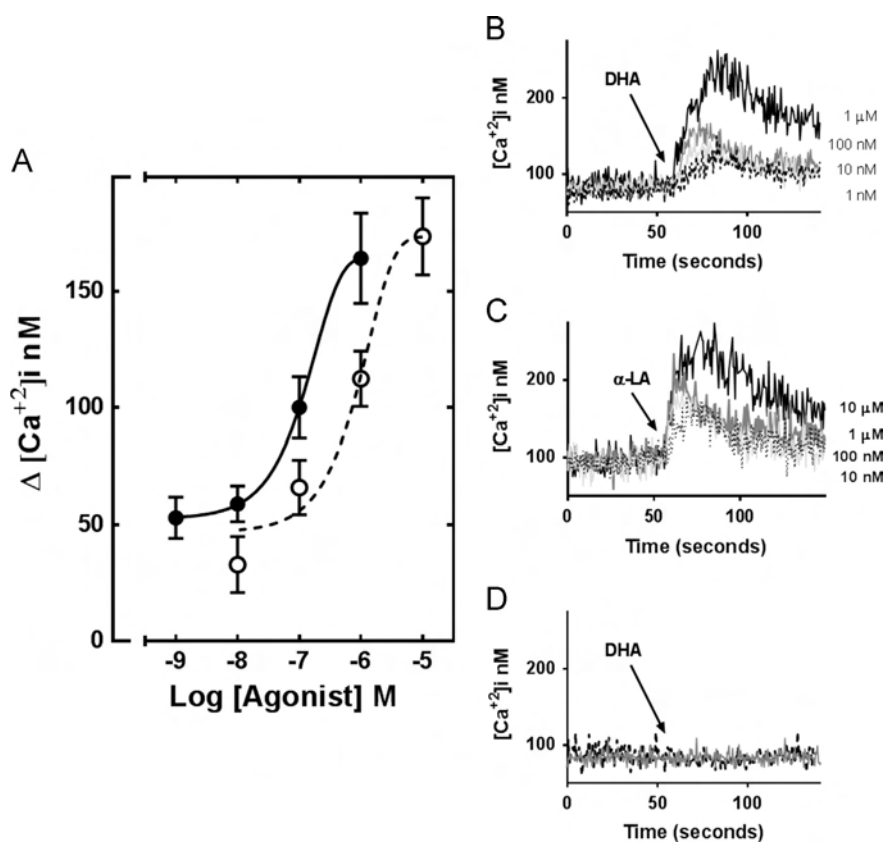


Fig. 1. Effect of DHA and α -LA on intracellular calcium concentration. Panel A: increases in intracellular calcium concentration ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) in cells challenged with the indicated concentration of DHA (solid circles) or α -LA (open circles). Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 5 to 6 determinations using different cells preparations. Panel B: Representative tracings of DHA-triggered intracellular calcium increases. Panel C: α -LA-triggered intracellular calcium increases. Arrow indicates the time of addition of the concentration of these fatty acids indicated at the right. Panel D: absence of effect of 1 µM DHA on intracellular calcium in cells expressing the free Venus protein (solid line) and uninduced GPR120-Venus cells (dotted line).

with protein A-agarose. After five washes, pellets containing the immune complexes were boiled for 5 min in sodium dodecyl sulfate-sample buffer containing dithiothreitol 100 mM, and subsequently subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were dried and the level of receptor phosphorylation was assessed with a Molecular Dynamics PhosphorImager and the ImageJ software (Rasband, 1997–2004).

2.4. Microscopy and image analysis

Epifluorescence and differential interference contrast images were obtained using an Olympus 1×71 inverted microscope equipped with an Evolution VF camera (Media Cybernetics). In experiments employing confocal microscopy, cells were cultured on glass-bottom Petri dishes for 24 h before overnight-induction with 1 µg/ml doxycycline. Cells were treated with the indicated agents for 15 or 30 min and then fixed with 4% paraformaldehyde. Confocal images from 3 to 4 different cell preparations were obtained using a Fluoview FV10i confocal microscope (Olympus) equipped with LD lasers emitting at 405, 473, 635 and 559 nm, and a 60× water-immersion objective. Venus was excited at 473-nm and the emitted fluorescence was detected at 527 nm. At least 9 different images, with 15 to 20 cells per field, were obtained to estimate the amount of internalized receptors. The areas corresponding to the cell's cytoplasm were selected and the amount of fluorescence was quantified using ImageJ (Rasband, 1997–2004).

Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy was carried out using an Olympus TIRF illuminator system in an Olympus 1×81 inverted microscope with a 100×, 1.45 numerical aperture, Plan Achromat TIRF objective. A 488 nm argon laser was used as the light source.

2.5. Statistical analysis

Statistical comparison for only two conditions was performed utilizing the Student's *t* test and comparisons among multiple groups using ANOVA with the Bonferroni's post-test. In all statistical comparisons $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Calcium signaling

In agreement with data using other constructions (Hara et al., 2009; Hirasawa et al., 2005; Watson et al., 2012), docosahexaenoic acid (DHA) and α -linolenic acid (α -LA) induced a concentration-dependent increase in intracellular calcium (Fig. 1, panels A–C). Representative tracings are presented showing that these FFAs induced rapid and robust increases in intracellular calcium and that both the magnitude and the speed (slope) of the responses changed in response to the agonist concentration (Fig. 1, panels B and C). The maximal responses to the two agonist were similar (≈ 2.5 -fold baseline), with DHA being more potent than α -LA (EC_{50} values ≈ 0.1 µM and ≈ 1 µM, respectively) (Fig. 1, panel A). DHA did not increase intracellular calcium in uninduced GPR120-Venus cells or in cells that express free Venus protein but, in contrast, activation of endogenous receptors with 1 µM lysophosphatidic triggered a very clear effect, i.e., these cells had a fully responsive calcium signaling (Fig. 1, panel D and Supplementary Fig. S2). Taking into account all these data it is clear that the response to FFAs was due to expression of GPR120.

3.2. GPR120 phosphorylation

We next examined receptor phosphorylation. It can be observed in Fig. 2 panel A that the receptor is a phosphoprotein whose phosphorylation state was increased in response to these FFAs. Again, the maximum responses were similar, DHA ($EC_{50} \approx 1$ µM) being more potent than α -LA ($EC_{50} \approx 30$ µM). Both FFAs induced very rapid increases in receptor phosphorylation that reached their maximum within 5–15 min and slowly decreased afterward (Fig. 2, panel B).

Phorbol myristate acetate (PMA) induced a strong concentration-dependent increase in GPR120 phosphorylation of similar time-course and magnitude to those observed with the FFAs; the EC_{50} was ≈ 50 nM (Fig. 3, panels A and B, and Supplementary Fig. S3). Interestingly, preincubation with PMA did not alter the effect of 1 µM DHA on intracellular calcium (Fig. 3, panels C and D).

It is noteworthy that the autoradiographs show the major band detected. A representative whole-membrane autoradiograph accompanied by a Western blot and a photograph of the Ponceau red-stained membrane are shown in Supplementary Fig. S3. The presence of two bands can be observed in the stained membrane (left panel), which correspond to the heavy and light IgG chains. In the middle, a Western blot employing anti-GFP primary antiserum shows, in addition to the light IgG chain, two conspicuous bands: one of ≈ 70 –75 kDa, and another of ≈ 130 –200 kDa. The autoradiograph at the right shows that these latter two bands were metabolically labeled with radioactive phosphate and that such phosphorylation increased in both bands in parallel in response to the concentration of the agent used. The majority of the label was present in the ≈ 70 –75 kDa band; the higher molecular band detected in the Western blot was labeled with much less intensity and appears to be formed of different molecular entities (i.e., it was a portion of the membrane in which smeary radioactive background is present with a few more defined bands in it). The

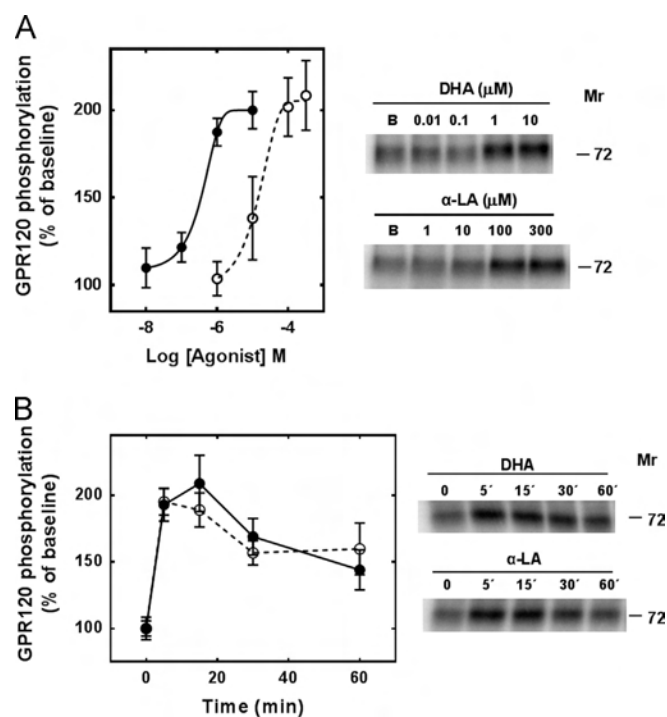


Fig. 2. Effect of DHA and α -LA on GPR120 phosphorylation. Panel A: cells were challenged with the indicated concentration of DHA (solid circles) or α -LA (open circles) and incubated for 5 min. Panel B: cells were incubated for the times indicated with 1 µM DHA (solid circles) or 100 µM α -LA (open circles). Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 4 to 6 determinations using different cells preparations. Representative autoradiographs are shown; B, baseline.

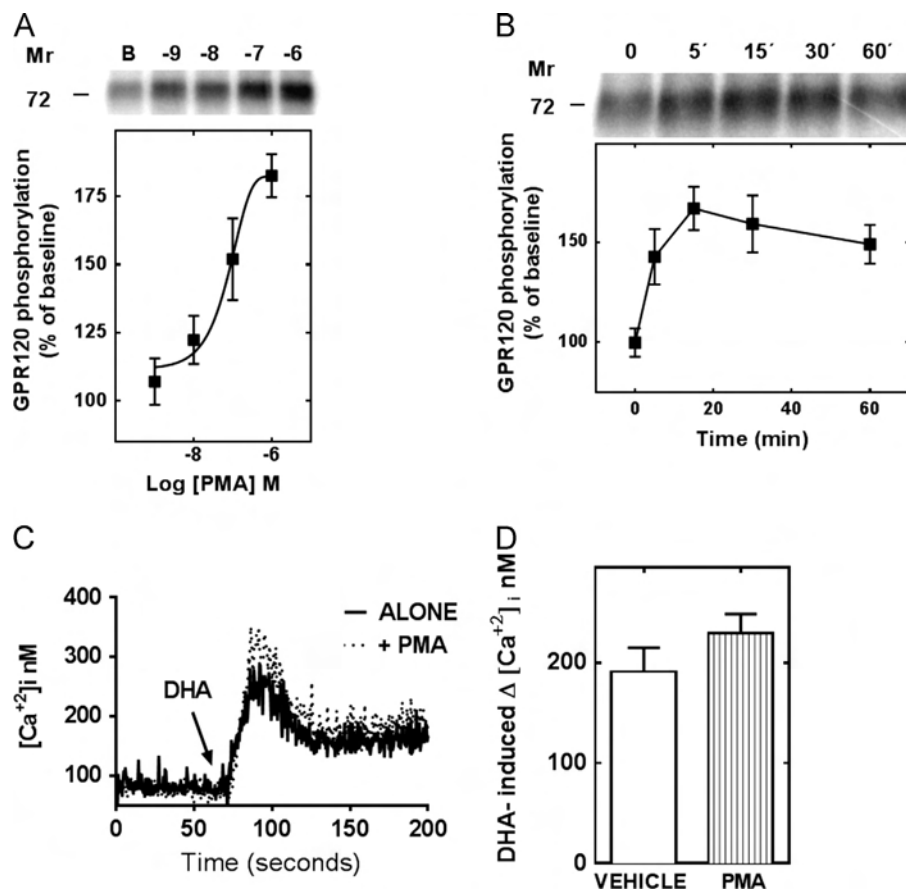


Fig. 3. PMA induced GPR120 phosphorylation but not desensitization. Panel A: cells were challenged with the indicated concentration of PMA for 15 min. Panel B: cells were incubated with 1 μ M PMA for the times indicated. In both cases means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 4 to 5 determinations using different cell preparations. Representative autoradiograms are shown above the graphs. B, baseline. Panel C: representative tracings of DHA-triggered intracellular calcium increases in cells preincubated for 15 min with vehicle (solid line) or 1 μ M PMA (dotted line). Arrow indicates the time of addition of DHA. Panel D: increases in intracellular calcium induced by 1 μ M DHA in cells preincubated for 15 min with vehicle or 1 μ M PMA. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 5 determinations using different cell preparations.

free Venus protein was clearly detected by Western blotting but it was not phosphorylated (Supplementary Fig. S4).

3.3. GPR120 is phosphorylated through different pathways

We next examined the effect of PKC inhibitors on DHA- and PMA-induced GPR120 phosphorylation. Inhibitors by themselves had no statistically significant effect on baseline GPR120 phosphorylation, although hispidin and rottlerin slightly increased it and bis-indolylmaleimide I induced a small decrease (Supplementary Fig. S5). None of the inhibitors was able to block the effect of DHA on this parameter (Fig. 4, panel A). In contrast, Gö 6976 and bis-indolylmaleimide I completely blocked PMA-induced GPR120 receptor phosphorylation (Fig. 4, panel B).

The possibility that agonist-induced and PKC-induced GPR120 phosphorylation could be additive was tested. Our results indicate that receptor phosphorylation was more intense when both stimuli were present than with any one of these alone, but no clear additivity was observed (Fig. 4, panel C).

3.4. GPR120 internalization

Confocal microscopy images showed that the GPR120-Venus construction was located at the plasma membrane and in internal vesicles (Fig. 5, panel A). Treatment with 1 μ M DHA for 15 min clearly decreased plasma membrane receptor density (as evidenced by a much less well-defined cell contour) and increased this in internal vesicles; the action of PMA was of smaller magnitude (Fig. 5,

panel A). Interestingly, cell incubation with both DHA and PMA resulted in greater internalization than that observed with any one of these agents alone, as observed in the images and confirmed by the quantitative analysis of the images (Fig. 5, panel B). At 30 min of incubation the effect of PMA continued to increase, whereas those of DHA alone or in combination with PMA did not to any significant extent (Fig. 5, panels A and B).

We also explored GPR120-Venus localization using TIRF microscopy. This technique allows observation of a small region of cells attached to glass (the evanescent wave range is around 200 nm, i.e., the plasma membrane (\approx 7–10 nm thick) and surroundings. Supplementary Fig. S6 shows that under non-stimulated condition amorphous fluorescence with a few more intense “dots” was observed and that no major change took place at 15 or 30 min. Such dots could represent large clusters of receptors within the plasma membrane or, more likely, internalized receptor-containing vesicles. Treatment with 1 μ M DHA induced a marked and progressive decrease in membrane fluorescence with formation of large amounts of such dots (Supplementary Fig. S6). As expected, cell treatment with 1 μ M PMA resulted in the same patterns of effects but at a slower rate (Supplementary Fig. S6); when cells were stimulated with DHA and PMA a similar pattern was observed (Supplementary Fig. S6).

4. Discussion

Our data show that GPR120 is a phosphoprotein whose phosphorylation state is modulated by agonists: DHA and α -LA, as well as

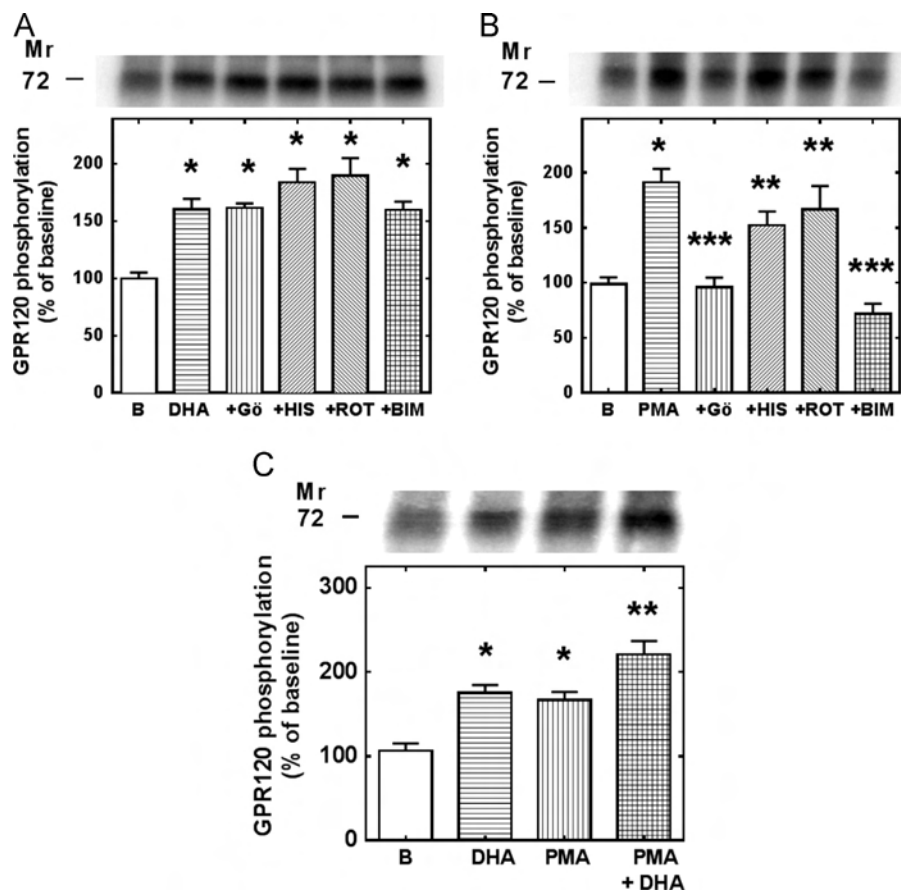


Fig. 4. Effect of protein kinase C inhibitors on DHA or PMA-induced GPR120 phosphorylation. Panel A: cells were incubated for 15 min in the absence or presence of 1 μ M of the inhibitors (Gö, Gö 6976, HIS, hispidin, ROT, rottlerin or BIM, bis-indolyl-maleimide 1) followed by additional 5 min in the absence (B, baseline) or presence of 1 μ M DHA and receptor phosphorylation was studied. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 5 determinations using different cells preparations. * $P < 0.005$ vs. baseline (B). A representative autoradiogram is shown. Panel B: cells were incubated for 15 min in the absence or presence of 1 μ M PMA. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 5 determinations using different cells preparations. * $P < 0.001$ vs. baseline (B); ** $P < 0.01$ vs. baseline (B); *** $P < 0.01$ vs. PMA without any inhibitor. Panel C: cells were incubated in the absence (B, baseline) or presence of 1 μ M DHA for 5 min or 1 μ M PMA for 15 min; when both agents were present, incubation time was initiated by the addition of PMA, and DHA was added during the last 5 min (total 15 min). Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 6–7 determinations using different cell preparations. A representative autoradiograph is presented. * $P < 0.005$ vs. baseline (B), ** $P < 0.001$ vs. baseline (B) and $P < 0.05$ vs. DHA or PMA alone.

by direct activation of PKC by PMA. The time-course of GPR120 phosphorylation (long and short forms) in response to a single concentration of DHA and α -LA was previously reported by other authors employing FLAG-tagged receptors; they detected bands of ≈ 42 kDa (Burns and Moniri, 2010). In our experiments, a major band of ≈ 70 –75 kDa was observed that corresponds to the expected mass of short variant GPR120-Venus construction (i.e., GPR120 ≈ 42 kDa plus Venus ≈ 27 kDa). While this paper was under review, a manuscript was published on-line that studied agonist-mediated GPR120 phosphorylation and high molecular weight bands were also observed, although no major comment was made on the finding (Hudson et al., 2013). In our opinion, the presence of higher molecular weight bands, detected by Western blotting and metabolic labeling, is of interest because it suggests the possibility that this receptor might form complexes with receptors and/or other signaling entities. Homo- and heterodimerization are certainly very attractive options, considering their potential for signaling and cell trafficking (Salahpour et al., 2000). It should be stated that our data only suggest this possibility, but obviously several different approaches would be required to confirm or discard such a suggestion.

FFAs concentration–response curves for increasing intracellular calcium and receptor phosphorylation showed a difference of ≈ 1 order of magnitude indicating a relatively large receptor reserve, which is expected for a transfected model, and that high receptor occupancy is necessary to induce receptor

phosphorylation. Current ideas indicate that receptor phosphorylation is a very initial step in the GPCR desensitization of G protein-dependent signaling and the initiation of β -arrestin-dependent events (García-Sáinz et al., 2011; Vázquez-Prado et al., 2003; Violin and Lefkowitz, 2007). G protein-coupled kinases (GRKs), second messenger-activated kinases, and some receptor tyrosine kinases appear to be key players in these events (García-Sáinz et al., 2011; Vázquez-Prado et al., 2003; Violin and Lefkowitz, 2007). PKC phosphorylates many GPCRs including, among others, α_1 -adrenergic receptors (García-Sáinz et al., 2001; Vázquez-Prado et al., 1997, 2000), AT₁ angiotensin II receptors (García-Caballero et al., 2001) and LPA₁ lysophosphatidic acid receptors (Avendaño-Vázquez et al., 2005). In the majority of cases, receptor phosphorylation is associated with clear attenuation of function. However, the α_1 -adrenergic receptor, such as GPR120, is phosphorylated in response to phorbol esters but is only marginally affected in its function (Vázquez-Prado et al., 2000). Our present data indicate that despite the fact that GPR120 is a PKC substrate; the phosphorylation catalyzed by this kinase, did not attenuate receptor function. The absence of effect of PKC inhibitors on FFA-induced receptor phosphorylation suggests that other kinases, such as GRK2 or GRK3 (Penn et al., 2000), could be the major modulators. Consequently, it appears likely that the GPR120 phosphorylation patterns induced by FFAs and PKC activation might differ. This possibility is supported by

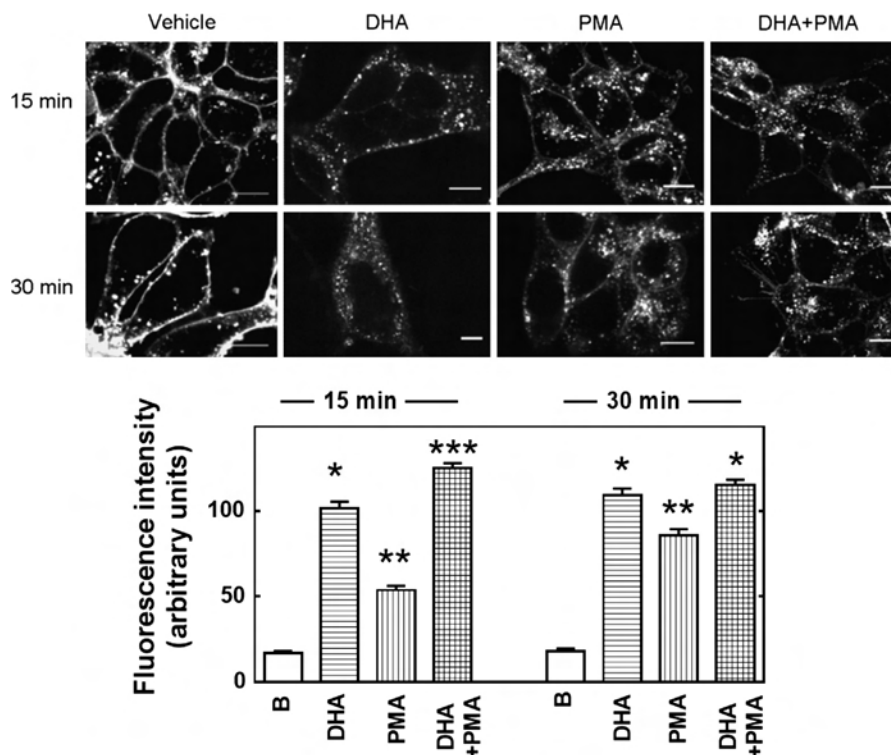


Fig. 5. Effects of DHA and PMA on GPR120 internalization. Panel A: representative confocal micrographs of cells incubated for 15 or 30 min with vehicle, 1 μ M DHA, 1 μ M PMA, or 1 μ M DHA plus 1 μ M PMA. Bar=10 μ m. Panel B: quantification of intracellular fluorescence (GPR120-Venus internalization). Cells were excited and the emitted fluorescence was detected as described in Section 2. Images with 15 to 20 cells were obtained; the areas corresponding to the cytoplasm were selected and the amount of fluorescence was quantified as indicated. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 80–100 individual determinations (cytoplasmic fluorescence) using different cell preparations. * P <0.001 vs. baseline (B), ** P <0.001 vs. all other groups with the same incubation time, *** P <0.001 vs. all other groups with the same incubation time.

the fact that the phosphorylation state of the receptor was greater when DHA and PMA were present than when any one of these stimulated the cells alone; a likely possibility is that among the phosphorylated residues, some might be shared but others might not be.

Agonist-induced GPR120 internalization has been previously observed (Hirasawa et al., 2005; Hudson et al., 2013) and was confirmed here using confocal and TIRF microscopy added to the observation that PMA is also able to do so. The fact that DHA- and PMA-induced internalizations show partial additivity is of interest, particularly considering that a similar pattern was observed in the receptor phosphorylation experiments. To what extent these two processes are related remains to be determined; but it is possible that the phosphorylation patterns might participate in defining the receptor's internalization pathways.

PKC is a heterogeneous subfamily of protein kinases classified into three groups based on their structure and cofactor regulation: conventional, novel and atypical (Newton, 2010). To obtain some insight into the PKC isozymes involved in the actions of PMA we employed the non isoform-selective inhibitor, bis-indolyl-maleimide 1 and the following isoform-selective PKC inhibitors: PKC α -selective, Gö 6976 (Martiny-Baron et al., 1993), isoform β -selective, hispidin (Gonindard et al., 1997), and for isoform δ , rottlerin (Gschwendt et al., 1994). Although precise definition of the PKC isoform(s) involved in GPR120 phosphorylation will require the use of a variety of molecular biological tools, the very clear effect of Gö 6976 led us to suggest that conventional PKC isoforms participate in PMA-induced GPR120 receptor phosphorylation.

In summary, our data indicate that agonist action and PKC activation induce GPR120 receptor phosphorylation, through distinct mechanisms and with different functional consequences.

Acknowledgments

This research was partially supported by a Grant from CONACyT [153278]. O. B. Sánchez-Reyes and J. A. Castillo-Badillo are students of the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM and recipients of fellowships from CONACyT; this work constitutes a major part of O. B. Sánchez-Reyes thesis. We thank Dr. Luis Vaca for allowing us to use some of his equipment, the members of the Microscopy Unit of our Institute, Jonathan Pacheco and Aurelio Hernández-Méndez for their help and advice, and Dr. Rocío Alcántara-Hernández, Aurey Galván, Manuel Ortínez and Juan Barbosa for technical help. We also express our gratitude to Mrs. Margaret Brunner, MA, for style corrections. J.A. García-Sáinz dedicates this work to his former advisors, Drs. Victoria Chagoya and John N. Fain.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.003>.

References

- Avendaño-Vázquez, S.E., García-Caballero, A., García-Sáinz, J.A., 2005. Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1. *Biochem. J.* 385, 677–684.
- Burns, R.N., Moniri, N.H., 2010. Agonism with the omega-3 fatty acids alpha-linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 1030–1035.

- Castillo-Badillo, J.A., Molina-Munoz, T., Romero-Ávila, M.T., Vazquez-Macias, A., Rivera, R., Chun, J., Garcia-Sainz, J.A., 2012. Sphingosine 1-phosphate-mediated α_{1B} -adrenoceptor desensitization and phosphorylation. Direct and paracrine/autocrine actions. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 245–254.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866–1870.
- García-Caballero, A., Olivares-Reyes, J.A., Catt, K.J., García-Sáinz, J.A., 2001. Angiotensin AT(1) receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Roles of protein kinase c and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* 59, 576–585.
- García-Sáinz, J.A., Romero-Ávila, M.T., Alcántara-Hernández, R., 2011. Mechanisms involved in α_{1B} -adrenoceptor desensitization. *IUBMB Life* 63, 811–815.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Cuevas, F.G., Romero-Ávila, M.T., 2001. Phosphorylation and desensitization of α_{1D} -adrenergic receptors. *Biochem. J.* 353, 603–610.
- Gonindard, C., Bergonzi, C., Denier, C., Sergheraert, C., Klæbe, A., Chavant, L., Hollande, E., 1997. Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic toward cancer cells than normal cells in vitro. *Cell Biol. Toxicol.* 13, 141–153.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Gschwendt, M., Muller, H.J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., Marks, F., 1994. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 93–98.
- Hara, T., Hirasawa, A., Ichimura, A., Kimura, I., Tsujimoto, G., 2011. Free fatty acid receptors FFAR1 and GPR120 as novel therapeutic targets for metabolic disorders. *J. Pharm. Sci.* 100, 3594–3601.
- Hara, T., Hirasawa, A., Sun, Q., Sadakane, K., Itsubo, C., Iga, T., Adachi, T., Koshimizu, T.A., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Tsujimoto, G., 2009. Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 380, 247–255.
- Hirasawa, A., Hara, T., Katsuma, S., Adachi, T., Tsujimoto, G., 2008. Free fatty acid receptors and drug discovery. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1847–1851.
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., Tsujimoto, G., 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* 11, 90–94.
- Hudson, B.D., Shimpukade, B., Mackenzie, A.E., Butcher, A.J., Pediani, J.D., Christiansen, E., Heathcote, H., Tobin, A.B., Ulven, T., Milligan, G., 2013. The Pharmacology of a Potent and Selective Agonist, TUG-891, Demonstrates Both Potential Opportunity and Possible Challenges to Therapeutic Agonism of FFA4 (GPR120). *Mol. Pharmacol.* 84, 710–725.
- Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Lelouire, A., Liu, N., Iida, K., Choquet, H., Besnard, P., Lecoeur, C., Vivequin, S., Ayukawa, K., Takeuchi, M., Ozawa, K., Tauber, M., Maffei, C., Morandi, A., Buzzetti, R., Elliott, P., Pouta, A., Jarvelin, M.R., Korner, A., Kiess, W., Pigeyre, M., Caiazzo, R., Van Hul, W., Van Gaal, L., Horber, F., Balkau, B., Levy-Marchal, C., Rouskas, K., Kouvatsi, A., Hebebrand, J., Hinney, A., Scherag, A., Pattou, P., Meyre, D., Koshimizu, T.A., Wolowczuk, I., Tsujimoto, G., Froguel, P., 2012. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 483, 350–354.
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., Schachtele, C., 1993. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.* 268, 9194–9197.
- Moore, K., Zhang, Q., Murgolo, N., Hosted, T., Duffy, R., 2009. Cloning, expression, and pharmacological characterization of the GPR120 free fatty acid receptor from cynomolgus monkey: comparison with human GPR120 splice variants. *Comp. Biochem. Physiol. B* 154, 419–426.
- Newton, A.C., 2010. Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E395–E402.
- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., Olefsky, J.M., 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687–698.
- Penn, R.B., Pronin, A.N., Benovic, J.L., 2000. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 81–89.
- Rasband, W.S., 1997–2004. ImageJ, National Institutes of Health, (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).
- Salahpour, A., Angers, S., Bouvier, M., 2000. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 163–168.
- Sánchez-Reyes, O., Castillo-Badillo, J., Romero-Ávila, M., Takei, Y., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Villalobos-Molina, R., García-Sáinz, J., 2013. Phosphorylation and internalization of short splicing variant of the omega 3 fatty acid sensor, GPR120. *FASEB J.* 27. (Abstract 1173.5).
- Stoddart, L.A., Smith, N.J., Milligan, G., 2008. International Union of Pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, –2, and –3: pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacol. Rev.* 60, 405–417.
- Vázquez-Prado, J., Casas-González, P., García-Sáinz, J.A., 2003. G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell. Signal* 15, 549–557.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., García-Sáinz, J.A., 1997. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 27330–27337.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero-Ávila, M.T., González-Espinosa, C., García-Sáinz, J.A., 2000. Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *J. Biol. Chem.* 275, 6553–6559.
- Violin, J.D., Lefkowitz, R.J., 2007. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 416–422.
- Watson, S.J., Brown, A.J., Holliday, N.D., 2012. Differential signaling by splice variants of the human free fatty acid receptor GPR120. *Mol. Pharmacol.* 81, 631–642.

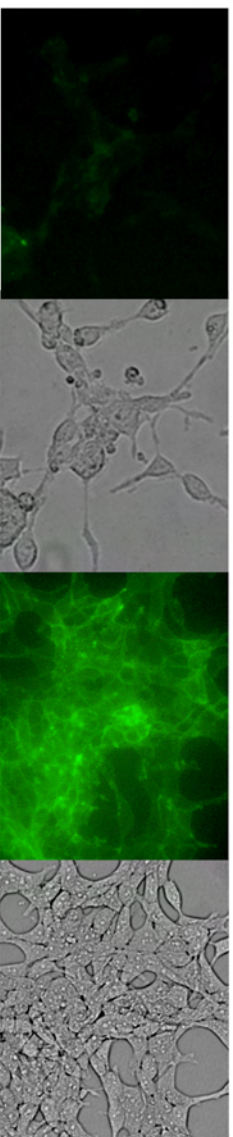
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Fig. S1. Epifluorescence and differential interference contrast images of cells transfected with plasmids for expression of the GRP120-Venus construction and the free Venus protein. Micrographs were taken before induction and 24 h after induction with doxycycline hyclate 1 $\mu\text{g/ml}$. Fluorescence was minimal before induction and flared-up afterwards. It can be observed that the free Venus protein was present inside the cells whereas the GPR120-Venus construction was mainly located in the plasma membrane and internal vesicles.

- Doxycycline

+ Doxycycline

GPR120-
Venus



Venus

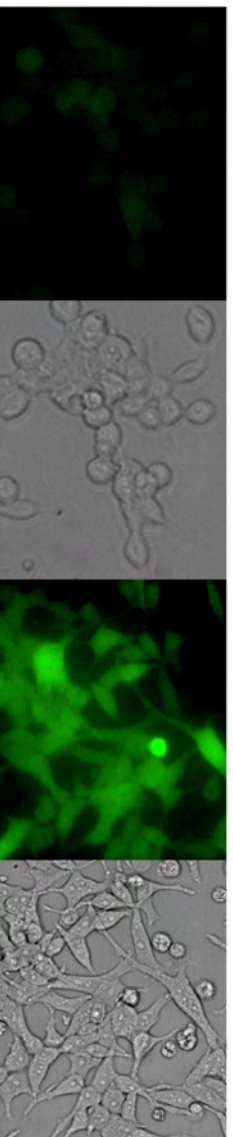


Fig. S2. Absence of effect of DHA and response to lysophosphatidic acid in control cells. Representative tracings showing the intracellular calcium concentration observed in response to 1 μ M DHA or 1 μ M lysophosphatidic acid (LPA) (arrows). Panel A: cells expressing the free Venus protein. Panel B: uninduced GPR120-Venus cells.

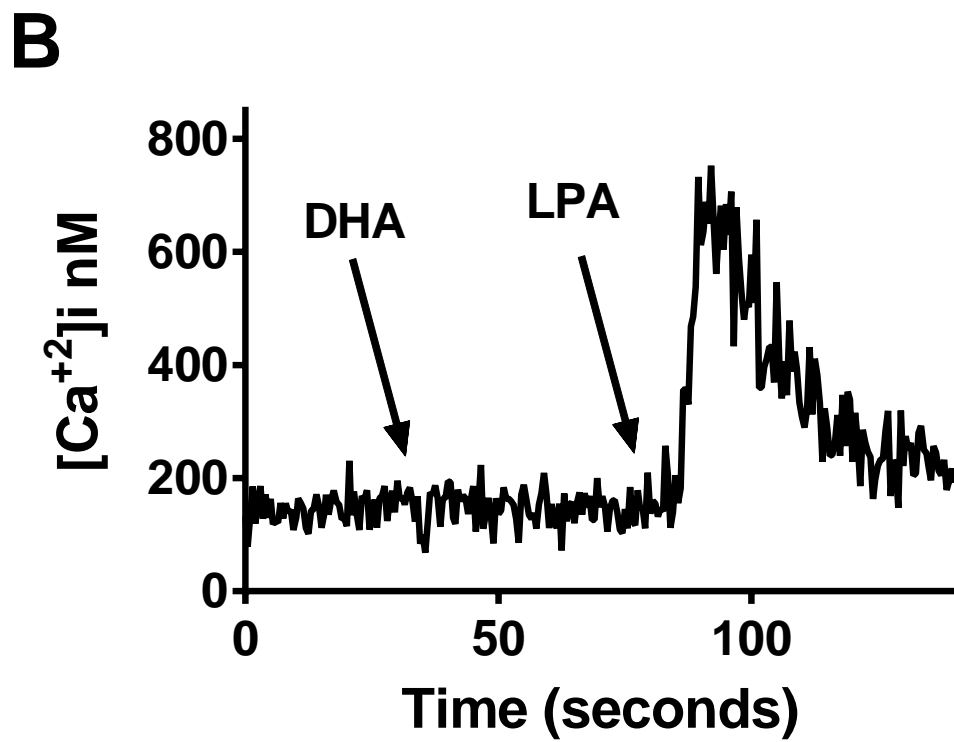
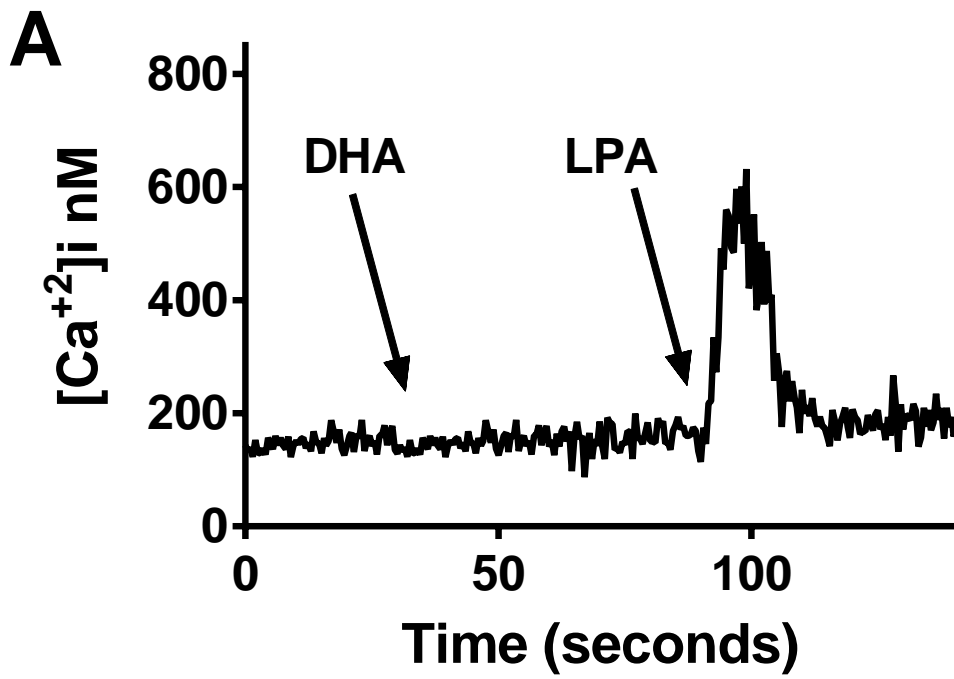
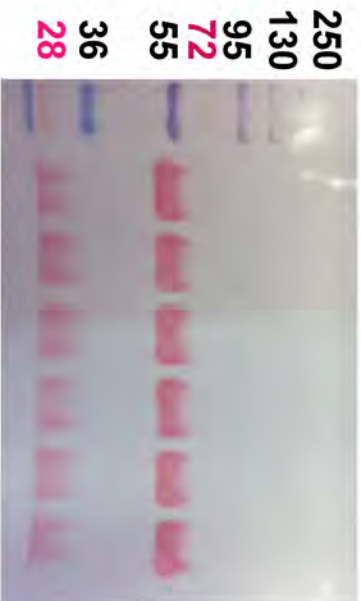


Fig. S3. Representative GPR120 phosphorylation experiment. Cells were incubated in the presence of vehicle (B, baseline) or the indicated concentrations of phorbol myristate acetate (PMA) for 15 min. Incubation was terminated and samples processed as described in Materials and Methods. Left panel: Ponceau red staining of immunoprecipitated samples, subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Stained molecular weight markers were run in the first lane and the molecular relative mass is indicated at the left; the two thick red bands present in the remaining lanes correspond to the heavy and light IgG chains. Middle panel: samples in the membrane were subjected to Western blot using a primary anti-green fluorescent protein (GFP) antibody. The light IgG chain was detected as well as two thick bands of \approx Mr 70-75 and 140-220 kDa. Right panel: autoradiography was performed and a major radioactive band of \approx Mr 70-75 was detected (the concentration-dependent effect of PMA is clearly observed) and several other bands were detected in the \approx Mr 140-220 kDa region.

Fig. S4. Representative control phosphorylation experiment. Cells expressing the free Venus protein or the GPR120-Venus construct were incubated in absence of any agent (B, baseline) or presence of either 1 μ M DHA or 1 μ M PMA for 15 min. Incubation was terminated and samples processed as described in Materials and Methods. Other indications as in Supplementary Fig. S3. Chemiluminescence reaction was carried out for a very short time to allow clear detection of the Venus protein (\approx 27 kDa) that runs very close to the IgG light chains during electrophoresis.

Ponceau red

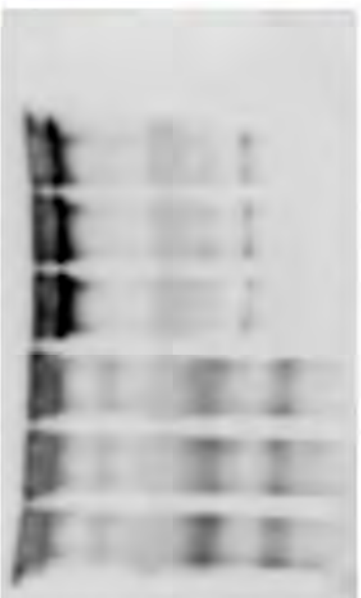
Venus GPR120



B
DHA
PMA
B
DHA
PMA

IB: anti-GFP

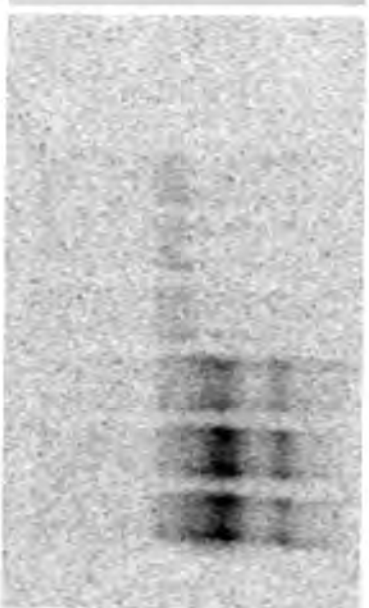
Venus GPR120



B
DHA
PMA
B
DHA
PMA

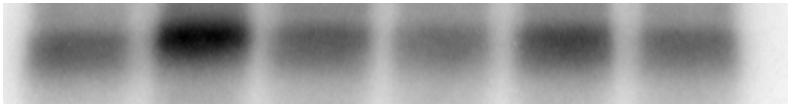
Autoradiography

Venus GPR120



B
DHA
PMA
B
DHA
PMA

Fig. S5. Effects of protein kinase C inhibitors on baseline GPR120 phosphorylation. Cells were incubated for 15 min in the absence or presence of 1 μ M of the inhibitors (Gö, Gö 6976, HIS, hispidin, ROT, rottlerin or BIM, bis-indolyl-maleimide I) followed by additional 15 min in the presence of vehicle; one sample was incubated during this last period in the presence of 1 μ M DHA (positive control) and receptor phosphorylation was studied. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 6 determinations using different cells preparations. * $P < 0.001$ vs. baseline (B). A representative autoradiograph is presented.



GPR120 phosphorylation
(% of baseline)

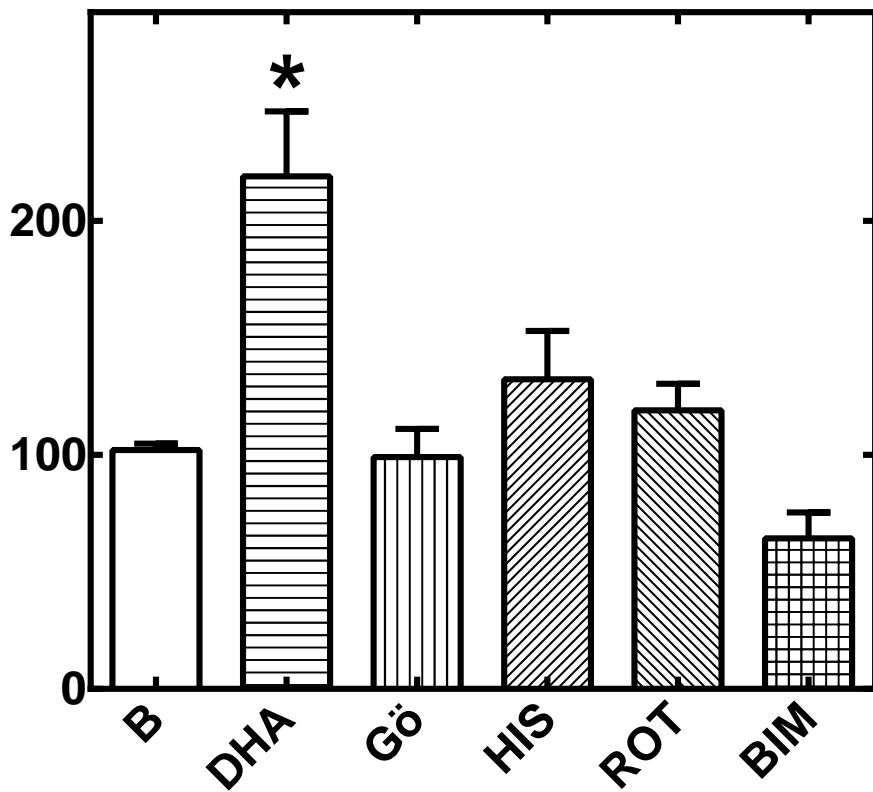


Fig. S6. Total internal reflection fluorescence microscopy images showing the effects of DHA and PMA on GPR-120 internalization. Representative TIRF micrographs of cells incubated for 15 or 30 min with vehicle, 1 μ M DHA, 1 μ M PMA or 1 μ M DHA plus 1 μ M PMA. Bar = 10 μ m. Images are representative of multiple observations using 3 different cell preparations.

