



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estructura/función del receptor α_{1D} adrenérgico

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Marco Antonio Alfonzo Méndez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. J. Adolfo García Sáinz
Instituto de Fisiología Celular-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Marina Macías Silva
Instituto de Fisiología Celular-UNAM

Dr. Jorge Vázquez Ramos
Facultad de Química-UNAM

Ciudad de México, Marzo de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. J. Adolfo García Sáinz, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamientos por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN200915) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (233156 y FOC 882).

Marco Antonio Alfonzo Méndez fue alumno del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y fue apoyado por una beca de posgrado de CONACyT, por la beca mixta de CONACyT para realizar una estancia de investigación en el extranjero y por el Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado para la presentación de trabajos en congresos nacionales e internacionales.

RECONOCIMIENTOS

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. J. Adolfo García Sáinz	IFC-UNAM
Dra. Marina Macías Silva	IFC-UNAM
Dr. Jorge Vázquez Ramos	FQ-UNAM

El jurado de examen doctoral estuvo integrado por:

Presidente	Dr. Félix Recillas Targa	IFC-UNAM
Vocal	Dra. Aliesha Araceli González Arenas	IIB-UNAM
Vocal	Dra. Claudia González Espinosa	CINVESTAV
Vocal	Dra. Erika Patricia Rendón Huerta	FM-UNAM
Secretario	Dra. Guadalupe Reyes Cruz	CINVESTAV

Agradezco la asesoría técnica de la Dra. Ma. Teresa Romero Ávila y la Dra. Rocío Alcántara Hernández.

Agradezco al personal de las Unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular:

Unidad de Imagenología

Dr. Fernando García Hernández
M. C. Rodolfo Paredes Díaz

Unidad de Biología Molecular

Dra. Laura Ongay Larios
Biol. Guadalupe Codiz Huerta
Biol. Minerva Mora Cabrera

Unidad de Cómputo

Ing. Juan Barbosa Castillo
Ing. Ivette Rosas Arciniega

Taller de Mantenimiento

Ing. Aurey Galván Lobato
Ing. Manuel Ortíz Benavides

Bioterio

Dr. Héctor Malagón
Dra. Claudia Rivera

Agradezco al Dr. Jerold Chun por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio en The Scripps Research Institute y al Dr. Richard Rivera por su asesoría técnica en ese periodo.

Agradezco al Dr. Ross Tomaino por su asesoría en el análisis de resultados de espectrometría de masas.

A la memoria del Dr. Antonio Alfonzo Celeni.

Por que no pudiste ser mejor ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Adolfo García Sáinz por aceptarme en su laboratorio, por brindarme suficiente libertad experimental, pero orientarme cuando perdía el rumbo. Por enseñarme a buscar el conocimiento de forma vertical y por ser un investigador y tutor ejemplar.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dra. Marina Macías, por siempre estar al pendiente de los avances de este proyecto, sus comentarios oportunos y su disposición.

Dr. Jorge Vázquez, por hacer que mis evaluaciones semestrales siempre representaran un gran reto y por su compromiso académico.

A mis tutores de la licenciatura (en orden de aparición).

Dra. Patricia Tato[†], por enseñarme siempre con una sonrisa.

Dra. Cristina Fernández, por ser mi primer contacto con la transducción de señales.

Dr. Alejandro Zentella, por ser mi padre académico.

A mi madre Alma y mi hermano Héctor, por ser mi motor.

A mis colaboradores del laboratorio: Tere, Rocío, Jean, Aure, Gabriel, David, sin su ayuda no hubiera sido posible.

A los García Sáinz "originals": Jean, Aure, Alejandro, Christian, Marco y Omar, por todas "las otras veces" y por ser unos verdaderos brokas.

A mis amigos: Idalia, Paloma, Mayté, Dafné, Rudolf y Alfred, los quiero.

A Lupita Jiménez, por su apoyo con el material de laboratorio.

A mis compañeros del 303 Sur: Gisselle, Juan Carlos, Alejandro, Sócrates, Aldo. Por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar.

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

Índice de Tablas y Figuras	9
Resumen.....	12
Abstract.....	13
Abreviaturas.....	14
1. Introducción.....	15
1.1. Receptores acoplados a proteínas G: generalidades.....	15
1.2. Receptores adrenérgicos: generalidades.....	16
1.3. El receptor α_{1D} adrenérgico.....	17
1.4. Vías de señalización del receptor α_{1D} adrenérgico.....	18
1.4. I. Vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+}	18
1.4. II. Vía de ERK.....	19
1.4. III. Otras vías de señalización activadas por GPCRs.....	20
1.5. Estructura de GPCRs: estado del arte.....	20
1.6. Estructura/función del receptor α_{1D} adrenérgico.....	21
1.7. Desensibilización de receptores.....	22
1.8. Modificaciones post-traduccionales de GPCRs.....	24
1.8. I. Fosforilación de GPCRs.....	25
1.9. Mapeo de sitios de fosforilación de GPCRs mediante espectrometría de masas.....	26
1.10. Proteínas asociadas a GPCRs.....	28
2. Justificación.....	31
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivo.....	33
5. Material y Métodos.....	34
5.1 Reactivos.....	34
5.2 Cultivo celular.....	34
5.3 Construcción y análisis de plásmidos.....	35
5.4 Transfección transitoria.....	36
5.5 Generación de líneas celulares estables resistentes a geneticina (G418).....	36
5.6 Generación de líneas celulares estables: sistema inducible Flp-In T-rex.....	36
5.7 Determinación de Ca^{2+} intracelular.....	37
5.8 Inmuno ensayos tipo Western blot.	37
5.9 Análisis de la actividad de ERK1/2 mediante FRET.....	38

5.10	Ensayo de reducción de MTT.....	38
5.11	Fosforilación e inmunoprecipitación de la tercera asa intracelular y del α_{1D} AR.....	39
5.12	Ensayos de coimmunoprecipitación.....	39
5.13	Análisis <i>in silico</i> del α_{1D} AR.....	40
5.14	Análisis de sitios de fosforilación mediante espectrometría de masas.....	40
5.15	Análisis de internalización de receptores por microscopía confocal.....	41
5.16	Análisis estadístico.....	41
6.	Resultados Parte I: Caracterización de las propiedades de señalización del α_{1D} -AR truncado en su región carboxilo.....	42
6.1	El α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo tiene señalización sesgada.....	42
6.2	El α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo inhibe la vía de ERK.....	47
6.3	La activación de ERK es dependiente de PKC.....	52
6.4	La vía de ERK está interrumpida entre PKC y Raf-1 en células que expresan el receptor $\Delta N\Delta C$	53
6.5	La expresión del α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo activa la vía de p38..	54
6.6	La expresión del α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo no afecta la viabilidad celular.....	55
7.	Resultados Parte II: Identificación y caracterización funcional de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga.....	57
7.1	Análisis <i>in silico</i> del α_{1D} -AR.....	57
7.2	Purificación del α_{1D} -AR para espectrometría de masas.....	61
7.3	El análisis de espectrometría de masas reveló un código de fosforilación del α_{1D} -AR y nuevas proteínas asociadas.....	64
7.4	Generación de mutantes de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR.....	67
7.5	Los dominios intracelulares del α_{1D} -AR tienen distintos perfiles de fosforilación.....	69
7.6	GRK2 y PKC α/β fosforilan al α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga.....	74
7.7	Residuos en la tercera asa intracelular y en la región carboxilo del α_{1D} -AR regulan la desensibilización de las señales de Ca^{2+}	78
7.8	La fosforilación en los dominios intracelulares del α_{1D} -AR regula la vía de ERK.....	80

7.9 La tercera asa intracelular del α_{1D} -AR es suficiente para activar la vía de ERK.....	83
7.10 Los dominios intracelulares del α_{1D} -AR regulan su localización y tráfico vesicular.....	86
8. Resumen de Resultados.....	90
9. Discusión.....	92
8.1 Parte I: Caracterización de las propiedades de señalización del α_{1D} -AR truncado en su región carboxilo.....	92
8.2 Parte II: Identificación y caracterización funcional de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga.....	95
10. Conclusiones.....	101
11. Bibliografía.....	105
12. Anexos.....	114
12.1 Anexo I: Plásmidos generados durante el trabajo de tesis.....	114
12.2 Anexo II. Líneas celulares generadas durante el trabajo de tesis.....	116
12.3 Anexo III: Secuencia primaria del α_{1D} -AR.....	117
12.4 Anexo IV: Perspectivas <i>in extenso</i>	118
• Papel de los grupos de sitios de fosforilación del α_{1D} -AR en su señalización.....	118
• Estudio del tráfico vesicular del α_{1D} -AR.....	119
• Validación de las proteínas asociadas al α_{1D} -AR identificadas por MS.....	121
• Mecanismo molecular de la dimerización de los receptores adrenérgicos α_{1D} y α_{1B}	123
• Papel del α_{1D} -AR en el núcleo.....	124
• Evaluación de la función de las mutantes del α_{1D} -AR en sistemas endógenos.....	126
12.5 Generación de líneas celulares estables: sistema de retrovirus recombinantes.....	127
12.6 Anexo VI: Artículos y reconocimientos.....	128

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Representación de estructura de receptores acoplados a proteínas G.....	15
Tabla 1. Fenotipos del ratón <i>knockout</i> del receptor α_{1D} adrenérgico.....	18
Figura 2. Vías de señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y de receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK).....	19
Figura 3. Modelo de desensibilización homóloga de GPCRs.....	23
Figura 4. Modelo de desensibilización heteróloga de GPCRs.....	24
Tabla 2. GPCRs y sus sitios de fosforilación detectados por espectrometría de masas..	27
Tabla 3. Proteínas asociadas al receptor α_{1D} adrenérgico.....	29
Figura 5. Representación de las mutantes del receptor α_{1D} -AR ΔN y $\Delta N\Delta C$	42
Figura 6. Repercusión funcional de la región carboxilo del α_{1D} -AR en la liberación de calcio intracelular.....	43
Figura 7. Implicación de la región carboxilo del α_{1D} -AR en la recaptura de calcio.....	45
Figura 8. Efecto de noradrenalina en la fosforilación de ERK.....	46
Figura 9. Las células Rat-1 silvestres no expresan receptores adrenérgicos endógenos.....	47
Figura 10. Efecto del ácido lisofosfatídico y el factor de crecimiento epidérmico en la fosforilación de ERK.....	48
Figura 11. Representación gráfica del sensor de ERK basado en FRET.....	49
Figura 12. Efecto del ácido lisofosfatídico en la fosforilación de ERK detectada con un sensor basado en FRET.....	50
Figura 13. La actividad de dominante negativa de ERK del α_{1D} -AR $\Delta N\Delta C$ es dependiente del tipo celular.....	51
Figura 14. La activación de ERK en células Rat-1 que expresan el receptor α_{1D} -AR ΔN es dependiente de PKC.....	52
Figura 15. Efecto de la activación farmacológica de PKC en la fosforilación de ERK.....	53
Figura 16. Efecto de la activación farmacológica de PKC en la fosforilación de Raf-1 y MEK1.....	54
Figura 17. Efecto de la noradrenalina y el forbol miristato acetato en la fosforilación de p38.....	55
Figura 18. Las mutaciones del α_{1D} -AR no repercuten en la viabilidad celular.....	56
Figura 19. Predicción de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR.....	57
Tabla 4. Predicción de las cinasas que fosforilan al α_{1D} -AR.....	58

Figura 20. Representación de los sitios probables de fosforilación del α_{1D} -AR.....	59
Figura 21. Modelado de la estructura tridimensional del α_{1D} -AR.....	60
Figura 22. Generación de una línea celular que expresa el α_{1D} -AR-GFP de forma inducible.....	62
Figura 23. Purificación del α_{1D} -AR para su análisis por espectrometría de masas.....	63
Tabla 5. Representación del código de fosforilación del α_{1D} -AR.....	65
Tabla 6. Los sitios de fosforilación en la región carboxilo del α_{1D} -AR obtenidos por espectrometría de masas.....	65
Tabla 7. Nuevas proteínas asociadas al α_{1D} -AR reveladas por espectrometría de masas.....	66
Figura 24. Comparación de los sitios de fosforilación identificados mediante análisis <i>in silico</i> y espectrometría de masas.....	67
Figura 25. Mutantes de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR.....	68
Figura 26. Cursos temporales de fosforilación de las mutantes del α_{1D} -AR en respuesta a noradrenalina.....	69
Figura 27. Cursos temporales de fosforilación de las mutantes del α_{1D} -AR en respuesta a forbol miristato acetato.....	70
Figura 28. La fosforilación en la tercera asa intracelular y la región carboxilo del α_{1D} -AR es equitativa.....	71
Figura 29. Fosforilación de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR.....	73
Figura 30. GRK2 fosforila la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR.....	75
Figura 31. PKC fosforila la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR.....	76
Figura 32. Papel de las isoformas α/β de PKC en la fosforilación de la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR.....	77
Figura 33. Repercusión funcional de las mutaciones de la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR en la desensibilización de las señales de calcio.....	79
Figura 34. Efecto de las mutaciones de la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR en la vía de ERK.....	81
Figura 35. La inhibición de GRK2 mimetiza el fenotipo de las mutantes de la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR en la vía de ERK.....	82
Figura 36. Predicción de la estructura secundaria de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR.....	83
Figura 37. Efecto de la expresión de formas solubles de la tercera asa del α_{1D} -AR en la vía de ERK.....	85

Figura 38. Evaluación de la expresión de las mutantes del α_{1D} -AR mediante microscopía confocal.....	86
Figura 39. Internalización del α_{1D} -AR ΔN durante su desensibilización homóloga y heteróloga.....	87
Figura 40. Internalización del α_{1D} -AR ΔN -mutIL3 durante su desensibilización homóloga y heteróloga.....	88
Figura 41. La región carboxilo del α_{1D} -AR se requiere para su internalización.....	89
Figura 42. Modelo de acción de la noradrenalina y el factor de crecimiento epidérmico en la activación de la vía de ERK.....	102
Figura 43. Mecanismo de la mutante con actividad de dominante negativa de la vía de ERK (α_{1D} -AR $\Delta N\Delta C$).....	102
Figura 44. Los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR.....	103
Figura 45. Modelo de la desensibilización homóloga del α_{1D} -AR.....	104
Figura 46. Modelo de la desensibilización heteróloga del α_{1D} -AR.....	104
Figura 47. Identificación de los grupos de sitios de fosforilación del α_{1D} -AR.....	119
Figura 48. Generación y expresión de dos mutantes del α_{1D} -AR fusionadas a la proteína DsRed.....	120
Figura 49. Otros residuos de serina en la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR regulan su localización en la membrana plasmática.....	121
Figura 50. Generación y expresión de proteínas GST fusionadas a la tercera asa intracelular soluble del α_{1D} -AR.....	122
Figura 51. Identificación de los motivos GXXXG en los segmentos transmembranales de los receptores α_{1D} y α_{1B} adrenérgicos.....	123
Figura 52. Identificación de una probable secuencia de localización nuclear del α_{1D} -AR.....	125
Figura 53. Generación y expresión de proteínas GST fusionadas a la tercera asa intracelular soluble del α_{1D} -AR.....	126

RESUMEN

Los receptores α_{1D} -adrenérgicos (α_{1D} -ARs) son proteínas de siete cruces transmembranales que median las acciones de la noradrenalina. Existe un gran interés en investigar la señalización regulada por dominios intracelulares de receptores, así como sus modificaciones post-traduccionales. Sin embargo, los estudios estructura/función del α_{1D} -AR son escasos. Por lo anterior, el objetivo de esta tesis fue identificar y caracterizar funcionalmente los sitios de fosforilación y las cinasas del α_{1D} -AR durante su desensibilización. Para lograrlo, usamos una combinación de análisis *in silico*, espectrometría de masas y mutagénesis sitio-dirigida. Posteriormente, evaluamos el estado de fosforilación del receptor, la liberación de Ca^{2+} , la activación de MAP cinasas y el tráfico vesicular.

Encontramos que la noradrenalina incrementa la fosforilación de ERK en fibroblastos de rata (Rat-1) que expresan α_{1D} -ARs truncados en la región amino. Sin embargo, en las células que expresan receptores truncados tanto en el amino como en la región carboxilo ($\Delta N\Delta C$), la activación mediada por noradrenalina fue casi abolida. La fosforilación de ERK, que normalmente ocurre a través de la activación de GPCRs endógenos, de receptores de EGF y de la proteína cinasa C, también se encontró disminuida. Esto sugiere que elementos río abajo de la vía de la MAP cinasa fueron afectados. La fosforilación de Raf-1 y MEK1 también se encontró disminuida en las células Rat-1 que expresan los receptores doblemente truncados. Adicionalmente, encontramos que la sobre expresión de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR no mimetiza el efecto de la delección del carboxilo, pero es suficiente para activar la vía de ERK.

Por otro lado, describimos diferentes patrones de fosforilación del receptor durante su desensibilización mediada por noradrenalina (homóloga) o por factores no relacionados (desensibilización heteróloga). Identificamos los sitios de fosforilación específicamente en la tercera asa intracelular (IL3) y en la región carboxilo del receptor. Los sitios de fosforilación aquí descritos parecen ser necesarios no solo para la localización e internalización del receptor sino para la regulación de las vías de ERK y recambio de fosoinositidos/ Ca^{2+} . Finalmente, probamos experimentalmente que la cinasa GRK2 fosforila al α_{1D} -AR al activarse con noradrenalina, mientras que las isoformas α/β de PKC hacen lo propio ante la estimulación sostenido por agentes no relacionados. Por lo que inferimos que GRK2 y PKC participan en la generación de la señalización diferencial observada.

Este trabajo representa la primera caracterización funcional de los sitios de fosforilación del α_{1D} -RA durante la desensibilización homóloga y heteróloga y contribuye a entender sus mecanismos de regulación. Ya que el α_{1D} -RA participa en el control de la presión arterial y en la patogénesis de la hipertrofia prostática benigna, este estudio podría ayudar al diseño de agentes terapéuticos más efectivos.

ABSTRACT

Human α_{1D} -adrenoceptors (α_{1D} -ARs) are seven transmembrane-spanning proteins that mediate the actions of noradrenaline in health and disease. Recently, there has been a growing interest in investigating how receptor intracellular domains as well as post-translational modifications, such as phosphorylation, modulate signaling. However, there are no studies focused on the structure/function of the α_{1D} -AR carboxyl tail and the third intracellular loop. Therefore, the objective of this work was to identify and functionally characterize the phosphorylation sites and kinases involved in α_{1D} -AR signaling triggering and turning off. We highlighted the involvement of receptor intracellular domains in this process. In order to achieve this, we used a combination of *in silico* analysis, mass spectrometry and site-directed mutagenesis. Then we assessed receptor phosphorylation, intracellular calcium, mitogen activated protein (MAP) kinases activation and vesicular traffic.

We found noradrenaline-induced ERK phosphorylation in Rat-1 fibroblast expressing amino-truncated α_{1D} -ARs. However, in cells expressing receptors with both amino and carboxyl terminus-truncated ($\Delta N\Delta C$) α_{1D} -ARs, noradrenaline-induced activation was abrogated. Interestingly, ERK phosphorylation that normally occurs through activation of endogenous G protein-coupled receptors, EGF receptors and protein kinase C, was also decreased, suggesting that downstream steps in the mitogen-activated protein kinase pathway were affected. Phosphorylation of Raf-1 and MEK1 was also diminished in Rat-1 fibroblasts expressing double truncated α_{1D} -ARs. In addition, we found that over-expression of the α_{1D} -AR third intracellular loop cannot mimic the effect of the carboxyl tail truncation, but is enough to activate ERK pathway.

Moreover, we found a differential phosphorylation pattern upon noradrenaline receptor activation (homologous desensitization) as compared to pharmacological induced heterologous desensitization. Phosphorylation sites were found specifically at the third intracellular loop (IL3) and receptor carboxyl tail. Our results show that α_{1D} -AR phosphorylation residues might be necessary for receptor location and internalization as well as ERK and Ca^{2+} signaling regulation. Furthermore, we experimentally demonstrated that the G protein coupled receptor kinase GRK2, phosphorylate α_{1D} -AR upon noradrenaline stimulation, whereas PKC isoforms α/β during heterologous desensitization. Thus, GRK2 and PKC participate in generating the distinct signaling outcomes reported here.

This work represents the first α_{1D} -AR functional phosphorylation site mapping during homologous and heterologous desensitization and increase the knowledge on receptor regulation. Since α_{1D} -AR play a role in blood pressure homeostasis as well as benign prostatic hyperplasia, this study might help to better understand this disease and to design more effective therapeutic agents.

ABREVIATURAS

AR	(<u>A</u> drenergic <u>r</u> eceptor), receptor adrenérgico
BIM	<u>B</u> is <u>i</u> ndolil <u>m</u> aleimida
[Ca ²⁺] _i	Concentración intracelular de calcio
COOH	Región carboxilo
EGF	(<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>E</u> actor), factor de crecimiento epidérmico
ERK	(<u>E</u> xtracelullar signal regulated <u>k</u> inase), cinasa regulada por señales extracelulares
FRET	(<u>F</u> örster resonance <u>e</u> nergy transfer), transferencia de energía de resonancia de Förster
GFP	(<u>G</u> reen fluorescent <u>p</u> rotein), proteína verde fluorescente
GPCR	(<u>G</u> <u>p</u> rotein <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptor), receptor acoplado a proteína G
GRK	(<u>G</u> protein coupled receptor <u>k</u> inase), cinasa de GPCR
IL3	(Intracelullar loop <u>3</u>), tercera asa intracelular
LPA	(<u>L</u> ysophosphatidic <u>a</u> cid), ácido lisofosfatídico
MAPK	(<u>M</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase), cinasa activada por mitógenos
MS	(<u>M</u> ass <u>s</u> pectrometry), espectrometría de masas
NA	<u>N</u> or <u>a</u> drenalina
NH ₂	Región amino
PKA	(<u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>A</u>), proteína cinasa A
PKC	(<u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>C</u>), proteína cinasa C
PLC	(<u>P</u> hospholipase <u>C</u>), fosfolipasa C
PMA	(<u>P</u> horbol <u>m</u> yrystate <u>a</u> cetate), forbol-miristato-acetato (también TPA)
PTM	(Post-translational modification), modificación post-traducciona
RTK	(<u>R</u> eceptor <u>t</u> yrisine <u>k</u> inase), receptor con actividad de cinasa de tirosina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Receptores acoplados a proteínas G: generalidades.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son la familia más grande de receptores de membrana y comprenden el 3-5 % de los genes que codifican para proteínas en genomas secuenciados (Fredriksson et al., 2005). Se calcula que existen \approx 800 genes que codifican para GPCRs y han sido clasificados en cinco familias con base en sus características de unión a ligando, los mecanismos de señalización que activan, así como en su secuencia. Dicha clasificación incluye las familias de: glutamato, rodopsina, adhesión, frizzled/gusto y secretina (Fredriksson, et al., 2003).

Los GPCRs también son denominados receptores de siete dominios transmembranales debido a su característica estructura que presenta una región amino extracelular, una región carboxilo citoplásmica y siete dominios que atraviesan la membrana conectados entre sí por asas intra y extracelulares (Fig. 1) (Mustafi et al., 2009; Kobilka, 2013).

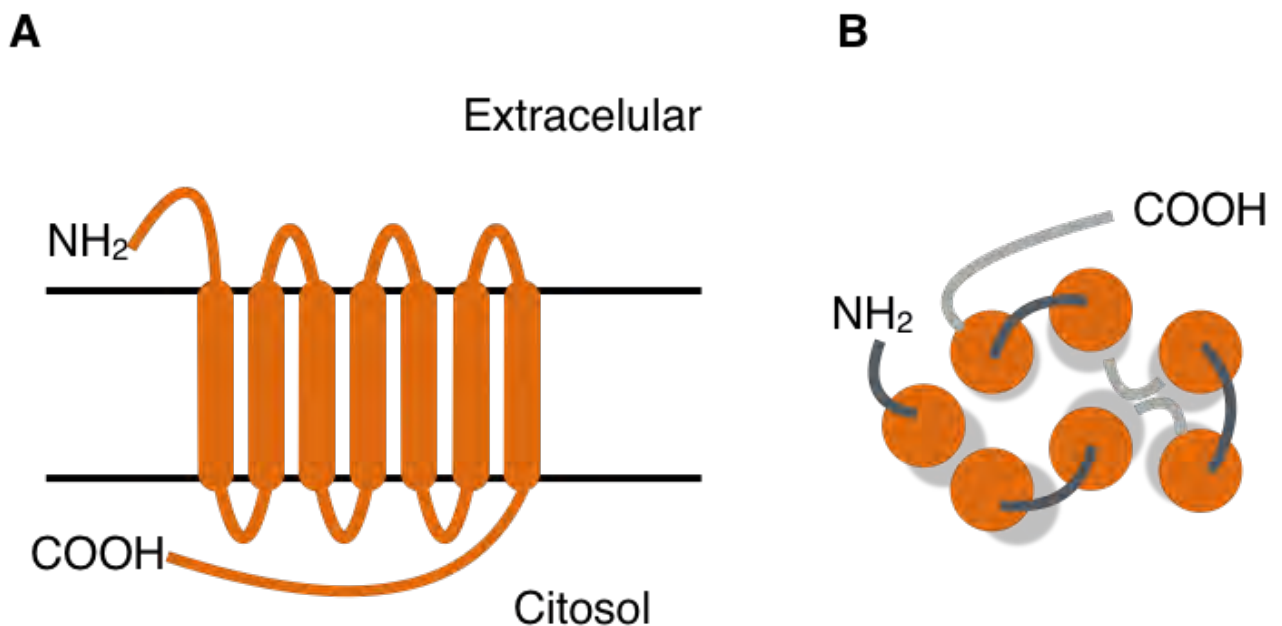


Figura 1. Representación de estructura de receptores acoplados a proteínas G. (A) Modelo de vista lateral en 2D. **(B)** Modelo de vista aérea. NH_2 , región amino; $COOH$, región carboxilo.

Los receptores de siete dominios transmembranales usualmente transducen sus señales al acoplarse a proteínas G heterotriméricas que modulan la actividad de enzimas, como la adenilil ciclasa o la fosfolipasa C y/o de canales iónicos. Estas proteínas efectoras incrementan o reducen la concentración de segundos mensajeros (AMP cíclico, IP3, diacilglicerol, calcio, etc) y de esta manera modulan enzimas, como proteínas cinasas, para propagar señales en el interior de la célula (Lefkowitz, 2013).

Una característica de los GPCRs es su capacidad para interactuar con un gran variedad de ligandos químicamente diversos. Por lo cual, los GPCRs median procesos fisiológicos clave que van desde la visión y el olfato, hasta la señalización en distintos sistemas como el respiratorio, nervioso, cardiovascular y el aparato digestivo, entre otros. Además, estos receptores participan a nivel global en la regulación de sistemas tales como el nervioso central, el sistema inmune y el endocrino. Por otro lado, esta familia de receptores también está involucrada en distintas enfermedades relevantes para la salud pública como la falla cardíaca, la hipertensión arterial, la diabetes, el cáncer de próstata o el asma bronquial, por mencionar algunas (Blumenthal, et al., 2011). Se estima que 30-40 % de los fármacos prescritos para tratar estas enfermedades tienen como blanco a receptores acoplados a proteínas G (Lagerstrom et al., 2008; Lefkowitz, 2013). Se espera que este porcentaje aumente debido al gran número de receptores cuyos ligandos se desconoce (receptores huérfanos) y al desarrollo de herramientas de mapeo farmacológico (Jacobson, 2015).

1.2. Receptores adrenérgicos: generalidades.

Los receptores adrenérgicos son un grupo heterogéneo de GPCRs. Estos receptores median las acciones centrales y periféricas de dos aminas naturales, la adrenalina y la noradrenalina (NA), al producir una respuesta celular que involucra a un segundo mensajero o a un canal iónico (García-Sáinz et al., 1999). Los receptores adrenérgicos (RA) están involucrados en la reacción de “pelea o huida”; es decir, la movilización de recursos causada por la activación del sistema nervioso simpático que prepara al cuerpo en situaciones de peligro o severa actividad (Docherty, 2010).

De acuerdo a sus perfiles farmacológicos, las similitudes en su secuencia y su señalización preferencial, los receptores adrenérgicos se han agrupado en tres subfamilias, α_1 -, α_2 - y β_1 -, cada una con tres miembros (Hieble et al., 1995). La subfamilia α_1 - está constituida por los receptores α_{1A} -, α_{1B} - y α_{1D} -. Se han construido mutantes con actividad constitutiva de algunos de estos receptores y han revelado información

importante sobre el proceso de activación del receptor, su potencial oncogénico y su relevancia en la caracterización de agentes farmacológicos (Cotecchia, 2007).

Los receptores α_1 -adrenérgicos juegan un papel importante en el funcionamiento del los sistemas cardiovascular, genitourinario y nervioso central. En el sistema cardiovascular, estos receptores regulan procesos fisiológicos como la contracción del músculo cardíaco y el músculo liso de las arteriolas. También se ha reconocido su participación en condiciones patológicas como la hipertrofia cardíaca o la isquemia inducida por las arritmias cardíacas (García-Sáinz et al., 1999). En el tracto genitourinario, los receptores α_1 -adrenérgicos participan en la contracción de diversas estructuras constituidas por músculo liso (García-Sainz y Villalobos-Molina, 2004).

1.3. El receptor α_{1D} adrenérgico.

El receptor α_{1D} fue clonado inicialmente de la rata por Lomasney et al. (1990) e identificado como el subtipo α_{1D} - por Perez et al (1991). Posteriormente, el ortólogo de humano fue clonado y localizado en el cromosoma 20 (Schwinn et al., 1995). El receptor α_{1D} humano está formado por una cadena polipeptídica de 572 aminoácidos, mientras que el de rata posee 561. Ambos ortólogos comparten el 83 % de identidad (Uniprot), presentando las mayores diferencias en la región carboxilo, que en humano tiene 167 aminoácidos y en rata 161. El peso molecular estimado de este receptor es de 59-60 kDa y el real es de 70-80 kDa; esta diferencia en pesos moleculares radica en el estado de N-glicosilación del receptor (Pupo et al., 2003).

El receptor se acopla al sistema de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} vía proteínas G_q a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC), pero con menor eficiencia que los otros subtipos (Vázquez-Prado et al., 1996). Pese a que se han descrito un número limitado de fármacos selectivos, se sabe que este receptor posee actividad intrínseca, es decir, independiente del agonista (Gisbert et al., 2000; Gisbert et al., 2002; García-Sáinz et al., 2010). De hecho, algunos antagonistas como el BMY 7378 pueden actuar como agonistas inversos, al disminuir el nivel basal en la liberación de calcio (García-Sáinz y Torres-Padilla, 1999). Recientemente se reportó un nuevo antagonista (TAK-259) que muestra mayor especificidad por el subtipo α_{1D} , este compuesto es selectivo, activo al ser administrado de manera oral y tiene efectos antipolaquiuria (Sakauchi et al., 2016).

El receptor α_{1D} tiene una expresión diferencial en distintos tejidos. En humanos, se encuentra en la aorta, la corteza cerebral y la próstata (Lomasney et al., 1991); de manera menos abundante en el corazón, el pulmón, el bazo y los riñones (Rokosh et al.,

1994). De forma consistente con las caracterizaciones farmacológicas descritas a la fecha (Villalobos et al., 1996), estudios con ratones knockout han mostrado que el subtipo α_{1D} juega un papel dominante en la contracción de la aorta (Tanoue et al., 2002a). Además, estos ratones presentan los cambios fenotípicos que se enlistan en la Tabla 1. Por lo anterior se ha asociado la función del receptor α_{1D} al mantenimiento de la presión sanguínea y a la patogénesis de la hipertensión (Villalobos-Molina et al., 1999; García-Sáinz y Villalobos-Molina, 2004).

Tabla 1. Fenotipos del ratón *knockout* del receptor α_{1D} adrenérgico.

Fenotipo comparado con el ratón silvestre	Referencia
Disminución de la presión arterial basal en reposo	Tanoue et al., 2002a
Disminución de la contracción de la aorta en respuesta a noradrenalina	Tanoue et al., 2002a
Incremento submáximo de la presión sanguínea en un modelo de hipertensión generada por sal	Tanoue et al., 2002b
Percepción al dolor atenuada	Harasawa et al., 2003
Mejor coordinación motora	Mishima et al., 2004
Disminución en la memoria y la atención	Mishima et al., 2004

*Modificada de Chen y Minneman, 2005.

1.4. Vías de señalización del receptor α_{1D} adrenérgico.

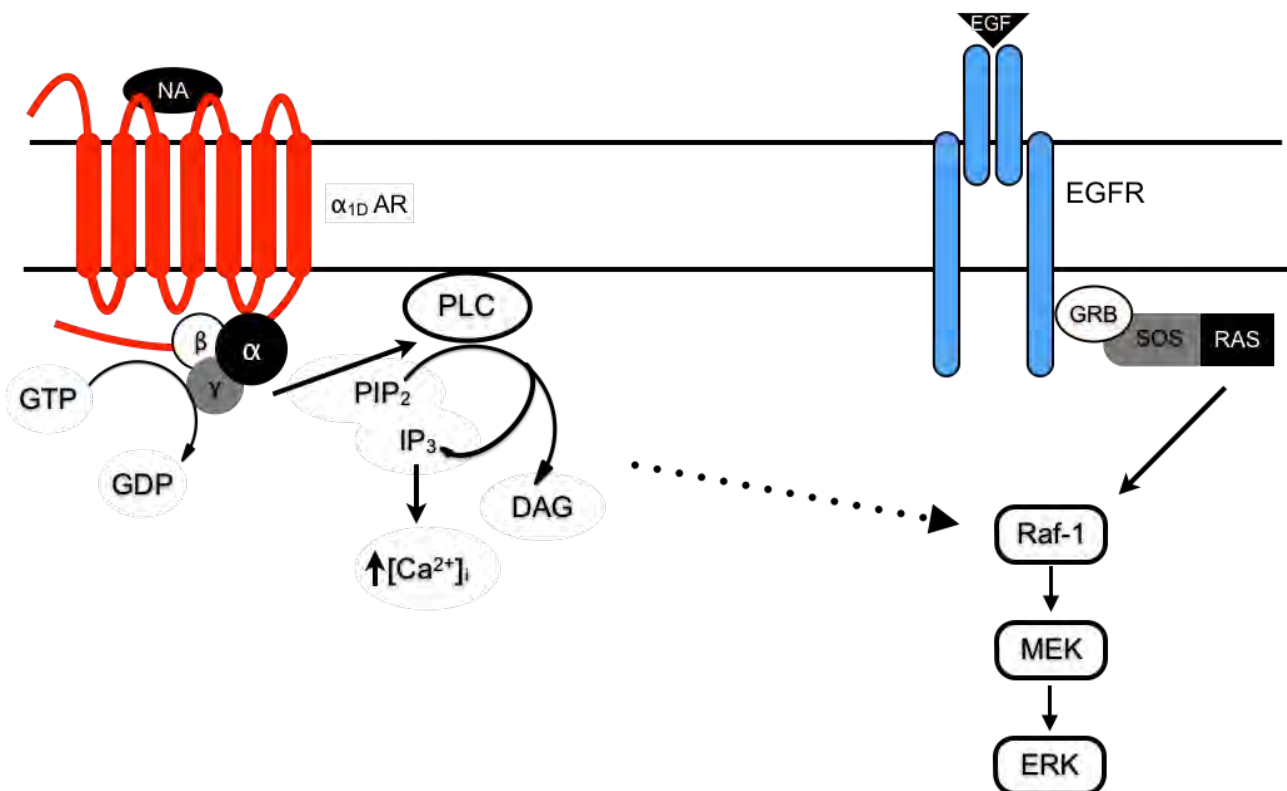
1.4. I. Vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} .

La transducción de la señal inicia cuando el agonista (noradrenalina o adrenalina) se une al receptor adrenérgico acoplado a una proteína G insensible a la toxina pertussis ($G_{q/11}$), que activa a la fosfolipasa C beta (PLC- β). Esta fosfolipasa promueve la hidrólisis de fosfatidil-inositol-1,4 bisfosfato (PIP₂), dando como resultado la formación de dos segundos mensajeros: por un lado el diacilglicerol (DAG) y por otro el inositol-1,4,5 trifosfato (IP₃). El IP₃ se une a su receptor canal localizado en el retículo endoplásmico y de esta manera se promueve la liberación del calcio atrapado en vesículas al citoplasma. Tanto el calcio liberado como el diacilglicerol estimulan a la proteína cinasa C (PKC), que junto con otras cinasas propaga la señal (Fig. 2) (García-Sáinz et al., 1980; Pérez et al., 1993).

1.4. II. Vía de ERK.

La vía de ERK, que forma parte de las MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), se activa en respuesta a factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1) (Fig. 2). Sin embargo, los receptores acoplados a proteínas G, también son capaces de activar esta vía de señalización (Keffel et al., 2000; McCune et al., 2000 y Waldrop et al., 2002) (Fig. 2). En la vía ERK, tres cinasas se fosforilan de manera secuencial en residuos de serina, treonina y tirosina (Widmann et al., 1999). La primera en ser fosforilada es Raf-1, que al fosforilarse se activa y fosforila a MEK, que a su vez se activa y fosforila a ERK1/2 (Maroni et al., 2004). La transducción de señales a través de esta vía tiene un papel central en una gran variedad de respuestas celulares que incluyen la proliferación, diferenciación y muerte celular. Estos procesos se llevan a cabo en parte debido a la translocación de ERK1/2 al núcleo, donde puede fosforilar moléculas blanco como los factores de transcripción Elk-1, lo cual lleva a cambios en la expresión génica (Shaw et al., 2003).

Figura 2. Vías de señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y de



receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK). NA, noradrenalina; α_{1D} -AR, receptor adrenérgico; EGF, factor de crecimiento epidérmico; α, β, γ , subunidades de la proteína G, PLC fosfolipasa C; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5 bis-fosfato; IP₃, inositol 1, 4, 5 tris-fosfato; PKC, proteína cinasa C, Raf-1, MEK, ERK, cinasas.

1.4. III. Otras vías de señalización activadas por GPCRs.

Existe evidencia de nuevos mecanismos de señalización distintos de la activación clásica dependiente de proteínas G y segundos mensajeros. Uno de estos mecanismos involucra a las proteínas β -arrestinas, una pequeña familia de proteínas citosólicas inicialmente identificadas por su papel central en la desensibilización de los GPCRs. Las arrestinas son reclutadas al receptor que ha sido fosforilado en respuesta a su agonista e inhibe de manera estérica el acoplamiento con la proteína G. De manera adicional, las β -arrestinas actúan como adaptadores en la endocitosis del receptor mediada por clatrina. Sin embargo, también se ha reconocido el papel de las β -arrestinas en la transducción de señales, mediante la formación de complejos de andamiaje con moléculas efectoras como Src, ERK 1/2 y JNK3 (McDonald et al., 2000; Lefkowitz y Shenoy, 2005).

1.5. Estructura de GPCRs: estado del arte.

La cristalografía de rayos X es el estándar de oro para estudiar la estructura de proteínas y complejos de las mismas con una resolución atómica. La primera estructura cristalográfica resuelta de un GPCR fue la rodopsina (Palczewski et al., 2000). A la fecha se han reportado 20 estructuras de receptores de la familia de la Rodopsina, dos de la familia de la Secretina, dos de la familia del Glutamato y una de la familia de los receptores Frizzled (Bortolato et al., 2014; Hollestein et al., 2014; Dore et al., 2014; Rosa et al., 2015). A este respecto, en 2012 el Premio Nobel de Química fue otorgado a Robert Lefkowitz y Brian Kobilka por su contribución al conocimiento sobre la estructura y función de los receptores β -adrenérgicos (Lefkowitz, 2013; Kobilka, 2013).

A pesar de estos avances, los estudios estructurales de GPCRs siguen siendo un reto considerable debido a la dificultad de expresar y purificar suficientes cantidades de receptores intactos y en su forma funcionalmente activa. Lo anterior impide la definición experimental de las propiedades estructurales de los receptores, así como sus interacciones (McCusker et al., 2007). Otra limitación de la cristalografía de rayos X es que esta tecnología no permite monitorear la dinámica de las proteínas (Hassell et al., 2007). Además, sólo se ha sido cristalizado un complejo de señalización: el receptor β_2 adrenérgico unido a la proteína G_s (Ramussen et al., 2011). Cabe mencionar que, aunque ya ha sido reportada la estructura del receptor de vasopresina V_2 unido a β -arrestina-1 (Shukla et al., 2013), ninguna estructura de GPCR que incluya modificaciones post-traduccionales ha sido descrita a la fecha.

1.6. Estructura/función del receptor α_{1D} adrenérgico.

A la fecha, ninguna estructura cristalográfica de los miembros de la familia de receptores α_1 -adrenérgicos ha sido resuelta. Lo anterior, debido a las dificultades técnicas en la purificación de proteínas que son inherentes a la alta hidrofobicidad de los GPCRs. Sin embargo, la disponibilidad de los cristales de rodopsina y de otros GPCRs ha permitido el modelaje tridimensional de los receptores α_1 -adrenérgicos (Cotecchia et al., 1998; Carrieri et al., 2001). De manera experimental se ha identificado una lisina en la región transmembranal 7 del receptor α_{1B} que forma un puente salino con un residuo de aspartato en la hélice 3. Dicho puente se rompe al activarse el receptor con su agonista (Porter et al., 1996). Mediante el uso de estudios de dinámica molecular y acoplamiento, se ha observado que la ruptura del puente salino es consistente con la activación del receptor α_{1D} y está conservado en los tres miembros de la familia α_1 (Carrieri et al., 2001).

Pese a los avances en el conocimiento de la relación estructura/función del receptor utilizando estrategias computacionales, los estudios del receptor α_{1D} aún son muy limitados. Lo anterior debido a la baja expresión de la proteína en sistemas endógenos y a su localización predominante en vesículas intracelulares en sistemas de sobre-expresión heteróloga (Chalothorn et al., 2002; Hague et al., 2004a; McCune et al., 2000). A este respecto, Hague y colaboradores reportaron la primera mutante del receptor α_{1D} y descubrieron que su localización subcelular está regulada negativamente por la región amino terminal del receptor. Lo anterior, ya que al truncar mediante técnicas de biología molecular los primeros 79 amino ácidos, el receptor cambia su localización de vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática (Pupo, et al., 2003; Hague et al., 2004b). Además, observaron que las quimeras de otros receptores con los 79 aminoácidos de receptor α_{1D} , permanecían secuestradas en vesículas intracelulares. Por lo que concluyeron que la señal de destino de este receptor está localizada en la región amino (Hague et al., 2004b). Este mismo grupo probó recientemente que los receptores α_{1D} existen en la naturaleza tanto en la forma completa como trunca en la región amino. Adicionalmente, identificaron el sitio de corte en los residuos L90/V91, lo que sugiere que este procesamiento proteolítico es un mecanismo fisiológico para lograr la expresión del receptor funcional en la membrana plasmática (Kountz et al., 2016).

Lo anterior, ha permitido generar líneas celulares que expresen de manera estable al receptor para estudiar su farmacología y transducción de señales. En nuestro

laboratorio reportamos la segunda mutante del receptor α_{1D} que consistió en una proteína doble trunca, por un lado carente de la región amino (1-79) y por otro sin la cola carboxilo terminal (448-572) (Rodríguez-Pérez et al., 2009a). Al probar esta mutante y compararla con la silvestre, se comprobó que los receptores α_{1D} de rata y de humano se regulan mediante desensibilización al ser fosforilados por PKC (García-Sáinz et al., 2001, 2004). Además, que su regulación también puede ser de manera heteróloga por efecto de hormonas que se unen a receptores con actividad de tirosina cinasa (Rodríguez-Pérez et al., 2009b) y finalmente que la región carboxilo es prescindible en estos procesos (Rodríguez-Pérez et al., 2009a). A la fecha, las dos mutantes arriba mencionadas son las únicas reportadas en la literatura.

1.7. Desensibilización de receptores.

La acción mediada por los GPCRs debe ser finamente modulada ya que la sobreestimulación de estos receptores por tiempos prolongados traería consecuencias fatales para la célula. Por tal motivo, la célula posee mecanismos de regulación de estos procesos. Uno de ellos es la desensibilización, que consiste en la pérdida de la capacidad de respuesta de los receptores a su ligando. Este proceso ocurre luego del estímulo hormonal y por lo general está asociado a la fosforilación del receptor, catalizada por distintas cinasas (Lefkowitz, 1998; García-Sáinz, 1999).

Existen dos formas de desensibilización, la homóloga, que ocurre en respuesta al propio agonista (Fig. 3) y la heteróloga, por acción de otros ligandos que activan otro tipo de receptores (Fig.4). Las cinasas de GPCRs (GRKs) y las cinasas dependientes de segundos mensajeros como la PKC y la PKA, participan en este proceso (Kato et al., 2009; Lutrell et al., 2010). La hipótesis más general y aceptada es que las GRKs son las encargadas de fosforilar a los receptores durante la desensibilización homóloga (Pitcher et al., 1998) (Fig. 3), mientras que las cinasas activadas por segundos mensajeros (PKC y PKA) lo hacen durante la desensibilización heteróloga (Fig. 4) (Vázquez-Prado et al., 2003).

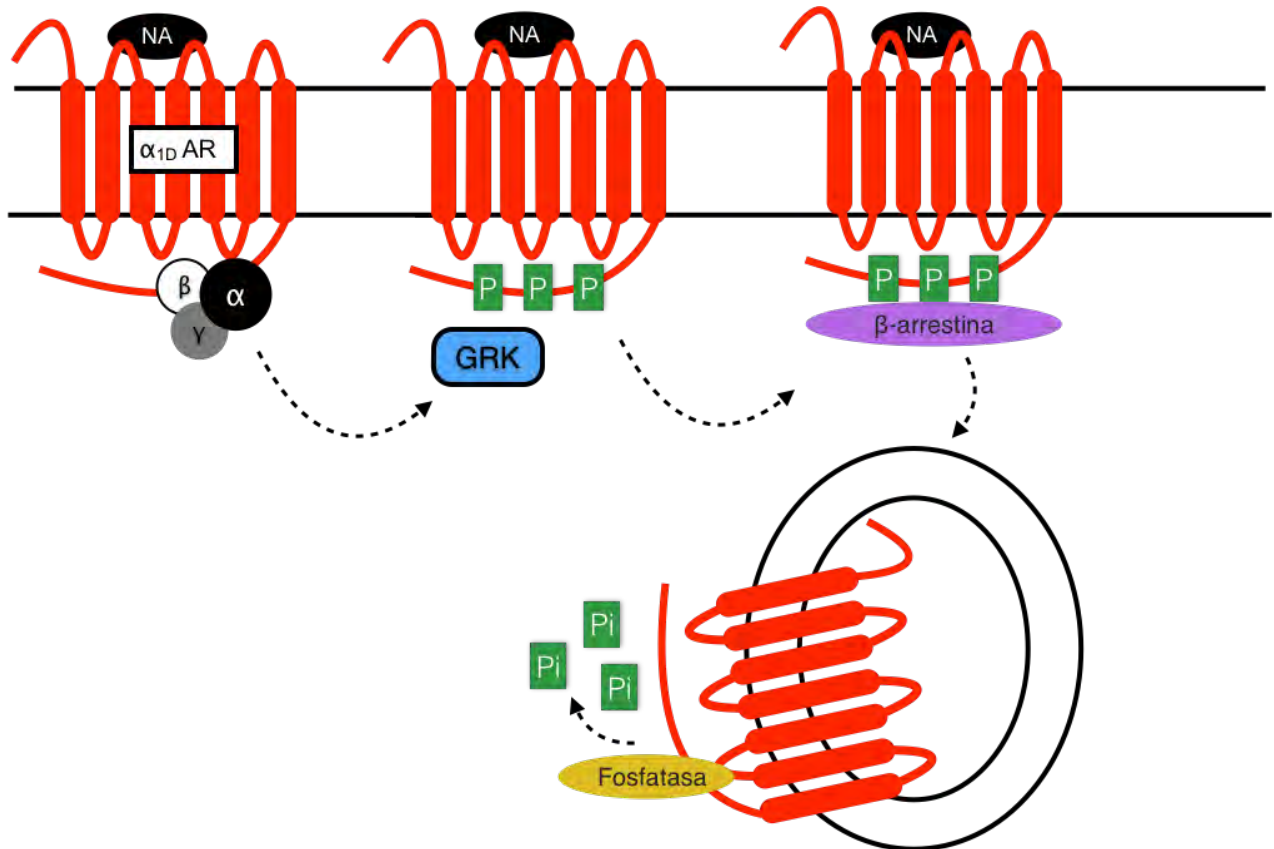


Figura 3. Modelo de desensibilización homóloga de GPCRs. NA, noradrenalina; α_{1D} -AR ΔN , receptor adrenérgico; GRK2, cinasa de GPCRs 2; α, β, γ , subunidades de la proteína G, PLC fosfolipasa C; PIP_2 , fosfatidilinositol 4.5 bis-fosfato; inositol 1, 4, 5 tris-fosfato. Se indican sitios de fosforilación en la tercera asa intracelular y la región carboxilo del receptor.

Se sabe que la activación de la PKC a través de los ésteres de forbol inhibe las acciones de los α_1 -ARs, ya que se observa un desacoplamiento en el recambio de fosfoinosítidos que ocurre de forma paralela a la fosforilación de los receptores (Corvera et al., 1986; García-Sáinz et al., 2011). Al fosforilar al receptor se favorece la unión de proteínas llamadas arrestinas, que a su vez inducen la unión de clatrina para formar vesículas que serán endocitadas en un proceso dependiente de GTP (Shenoy et al., 2011). Los receptores endocitados pueden reciclarse y dirigirse nuevamente a la membrana plasmática o ubiquitinarse y posteriormente degradarse en el lisosoma (Marchese et al., 2008).

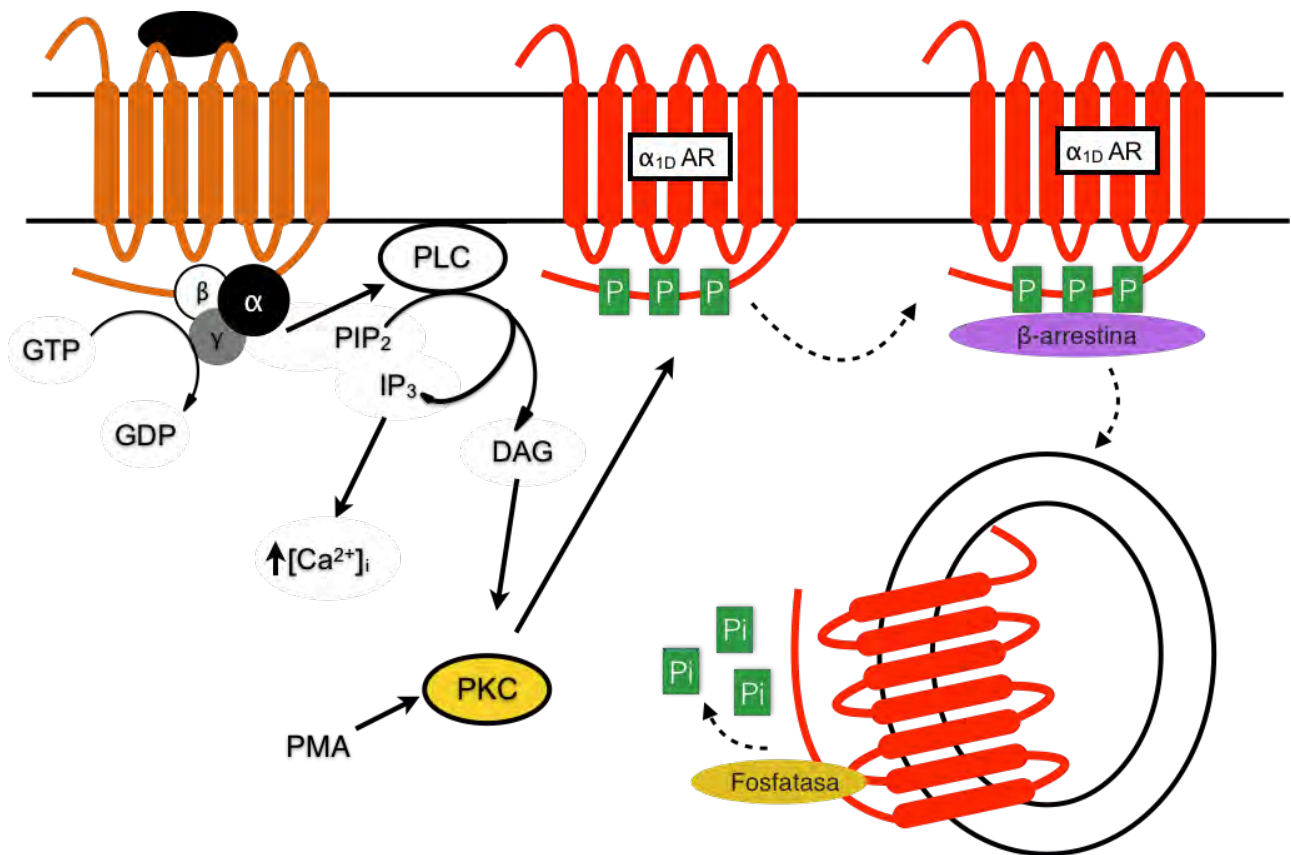


Figura 4. Modelo de desensibilización heteróloga de GPCRs. NA, noradrenalina; PMA, forbol miristato acetato; PKC, proteína cinasa C; α_{1D} -AR, receptor adrenérgico; GRK, cinasa de GPCRs 2; α, β, γ , subunidades de la proteína G, PLC fosfolipasa C; PIP_2 , fosfatidilinositol 4.5 bis-fosfato; inositol 1, 4, 5 tris-fosfato. Se indican sitios de fosforilación del receptor.

1.8. Modificaciones post-traduccionales de GPCRs.

Las modificaciones post-traduccionales (PTMs) son una serie de procesos dinámicos que cambian dependiendo del repertorio de proteínas sintetizadas en cada grupo celular y en respuesta a distintos estímulos externos. Dichas modificaciones repercuten funcionalmente en la regulación de la abundancia de proteínas, el tráfico vesicular, la localización celular, entre otras (Norskov-Lauritsen et al., 2015). A la fecha, 469 diferentes PTMs han sido reportadas en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>), 326 en eucariontes, 250 en bacterias, 80 en archea y más de 100 en *Homo sapiens*. De acuerdo al sitio PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/>), la fosforilación es la PTM más común al ser detectada en $\approx 17,500$ proteínas del proteoma humano. Entre otras PTMs comunes también se encuentran la ubiquitinación ($\approx 8,100$ proteínas), acetilación de

residuos de lisina ($\approx 6,700$ proteínas), metilación de residuos de lisina ($\approx 2,400$ proteínas) y glicosilación ($\approx 4,500$ proteínas) (Alfonzo-Méndez et al, 2016). Otras modificaciones reportadas con menor frecuencia incluyen la succinilación, SUMOilación, citrulinación, neidilación, puentes disulfuro y lipidación (Pagel et al., 2015).

Las modificaciones post-traduccionales más comunes en GPCRs incluyen fosforilación, palmitoilación, acetilación, glicosilación, y ubiquitinación, entre otras. Estas modificaciones covalentes juegan un papel central en la regulación de la señalización de los receptores (García-Sáinz et al., 2000; Xin et al., 2012). Se ha reportado con frecuencia la glicosilación de GPCRs en su región amino extracelular, mientras que la región carboxilo intracelular es blanco de fosforilación, palmitoilación y ubiquitinación. Entre estas modificaciones post-traduccionales, la fosforilación se ha asociado a la regulación de los ciclos de desensibilización/resensibilización de receptores (Vázquez-Prado et al., 2003). Por otro lado, la ubiquitinación participa en el tráfico de receptores hacia lisosomas para su degradación (Dores et al., 2012).

1.8. I. Fosforilación de GPCRs.

El estado de fosforilación de una proteína determinada es el resultado de la actividad de dos grupos de enzimas: cinasas y fosfatasas. Las cinasas son fosfotransferasas que incorporan el grupo fosfato gama del ATP a residuos de serina, treonina o tirosina. Por otro lado, las fosfatasas son hidrolasas que liberan el grupo fosfato de los residuos antes mencionados.

Muchos GPCRs son blancos de fosforilación y existe gran evidencia de que esta modificación está asociada a la desensibilización y tráfico intracelular de los receptores (Maeda et al., 2003; Tobin et al., 2008), aunque también existen reportes que sugieren mecanismos de desensibilización independiente de fosforilación (Ferguson, 2007). La fosforilación de GPCRs ocurre principalmente en residuos serina y treonina. Sin embargo, algunos grupos han reportado fosforilación de receptores en residuos de tirosina (Baltensperger et al., 1996; Gavi et al., 2006).

Esta adición de grupos fosfatos a los GPCRs ocurre frecuentemente en las regiones carboxilo terminal y tercera asa intracelular, donde se localizan múltiples sitios de fosforilación necesarios para asociación con proteínas de andamiaje como β -arrestina (Shukla et al., 2013). Se han descrito patrones diferenciales de fosforilación y se sugiere que estos “códigos de fosforilación” pueden determinar la función de los receptores (Tobin, 2008; Butcher et al., 2011). Estos patrones pueden ser específicos de cada célula o generarse diferencialmente en respuesta a agonistas, agonistas parciales o agonistas

inversos. Otra posible repercusión funcional de estos códigos es la activación preferencial de una determinada vía de señalización, fenómeno conocido como señalización sesgada (Rajagopal et al., 2010; Butcher et al., 2011).

1.9. Mapeo de sitios de fosforilación de GPCRs mediante espectrometría de masas.

Las partículas cargadas tienen dinámicas muy precisas al ser sujetas a campos eléctricos y magnéticos en vacío. La tecnología de espectrometría de masas (MS) explota este principio para separar iones de acuerdo a su relación masa/carga (Alberts, 2014). La espectrometría de masas se ha convertido en una técnica muy útil, no sólo para identificar secuencias de proteínas, sino también para estudiar sus estructuras al incorporar modificaciones post-traduccionales, así como para evaluar dinámica y plegamiento de proteínas (Na et al., 2008; Kaltashov et al., 2000). Por lo anterior, se ha propuesto como un complemento a los estudios de cristalografía de rayos X. Además, los experimentos de espectrometría de masas requieren cantidades pequeñas de muestra, no tiene límite de rango de masa y permiten un rápido procesamiento con una gran sensibilidad (Huang et al., 2014; Lee et al., 2015).

Para estudiar sitios de fosforilación en GPCRs se han utilizado a la par herramientas bioinformáticas de predicción *in silico*. Dichas predicciones han sido comprobadas *in cellulo* al combinarse con mutagénesis sitio-dirigida y análisis de espectrometría de masas (Mouledous et al., 2015; Alfonso-Garrido et al., 2015). Al purificarse los receptores y someterse a espectrometría de masas, tanto la secuencia de aminoácidos como los sitios de fosforilación pueden ser determinados simultánea e inequívocamente. Por esta razón, un número modesto pero creciente de laboratorios ha empleado esta estrategia para mapear los sitios de fosforilación de GPCRs. Los receptores estudiados a la fecha, los sitios de fosforilación relevantes, el dominio en donde se localizan los sitios, así como la función de los mismos, se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. GPCRs y sus sitios de fosforilación detectados por espectrometría de masas.

GPCR	Fosfo-péptidos identificados por MS	Dom	Función	Referencia
Rodopsina	DDDAS ³³⁴ ATASKTE DDDASATA ^{S338} KTE	COOH COOH	Inactivación	Ohguro et al., 1995
Rodopsina	DDDAS ³³⁴ ATASKTE DDDASATA ^{S338} KTE DDDASATASKTET ^{S343} QVAPA	COOH COOH COOH	Inactivación	Lee et al., 2002
β_2 -adrenérgico	LPGT ³⁸⁴ EDFVGHQGT ^{T393} VPS ^{S396} DN IDS ^{S401} QGRNCS ^{S407} T ^{T408} ND LPGT ³⁸⁴ EDFVGHQGT ^{T393} VPS ^{S396} DN IDS ^{S401} QGRNCS ^{S407} T ^{T408} ND ^{S411} LLDLPGT ³⁸⁴ EDFVGHQGT ^{T393} VPS ^{S396} DNIDS ^{S401} QGRNCS ^{S407} T ^{T408} ND	COOH COOH COOH	Desensibilización	Doronin et al., 2000
β_2 -adrenérgico	FHVQNL ^{S246} QVEQDGRRTRS ^{S261} SKFCL RS ^{S261} SKFCLKE RSS ^{S262} KFCLKE AYGNYS ^{S355} SNGNTGEQSGYHVEQEK AYGNYS ^{S356} NGNTGEQSGYHVEQEK LCEDLPGTEDFVGHQGTVPSDNIDS ^{S401}	IL3 IL3 IL3 COOH COOH COOH	Desensibilización	Nobles et al., 2011 Gao et al., 2014
V2-vasopresina	TGS ^{S255} PGEGAHVSAAVAK	IL3	No determinado	Wu et al., 2008
CRXC4	ALTSVSRGS ^{S323} S ^{S324} LIL	COOH	Desensibilización Internalización Señalización	Busillo et al., 2010
M3 Muscarínico	PS ^{S384} SDNLQVPD QAQKS ^{S412} MDDR QS ^{S577} VIFHK	IL3 IL3 COOH	Señalización	Butcher et al., 2011
Dopamina 2	HGLHSTPDS ^{S321} PAKPEK	IL3	Desensibilización Internalización	Jeong et al., 2013
GPR120/FFA4	GAILT ^{T347} DT ^{S350} VKR GAILTD ^{T349} S ^{S350} VKR RNDLS ^{S357} IISGYPYDVDPDYA	COOH COOH COOH	Desensibilización Reclutamiento de β -arrestina	Butcher et al., 2014

GPCR	Fosfo-péptidos identificados por MS	Dom	Función	Referencia
Apelina (APJ)	SAS ³⁴⁵ YSSGHSQGPQNMGK	COOH	Señalización sesgada	Chen et al., 2014
	SASYSS ³⁴⁸ GHSQGPQNMGK	COOH		
Neropeptido FF2 (NPFF2)	AKS ³⁶⁹ HVLINT ³⁷⁵ S ³⁷⁶ NQLVQESTFQNP	COOH	Desensibilización	Bray et al., 2014
	KS ³⁹⁸ AEKPQQELVMEELK	COOH		
	ETTNS ⁴¹⁸ EIESAMVSK	COOH		
μ-Opioide	EFCIPTSSTIEQQNS ³⁶³ AR	COOH	Internalización	Mouledous et al., 2015
	EHPS ³⁷⁵ TANTVDR	COOH		
	QNT ³⁷⁰ REHPSTANTVDR	COOH		
κ-Opioide	RQS ³⁵⁶ T ³⁵⁷ NRVRNTVADPASM RDVGG	COOH	Internalización	Chen et al., 2016
	RQSTNRVRNT ³⁶³ VQDPAS ³⁶⁹ MRD	COOH		
Receptor de hormona paratiroidea 1 (PTHr1)	S ⁴⁷³ WSRWTLALDKR	COOH	Interacción con β-arrestina	Zindel et al., 2016
	SGS ⁴⁹¹ SSSYSYGMPVSHTSVTNVGP	COOH		
	SGSS ⁴⁹² S ⁴⁹³ YSYGPMVSHTSVTNVGP	COOH		
	SGSSSYSYGPMVSHT ⁵⁰³ S ⁵⁰⁴ VTNVGP	COOH		
	VGLGLPLS ⁵¹⁸ PR	COOH		
	PGTPALET ⁵⁴⁸ LETPPAMAAPK	COOH		
	PGTPALETLET ⁵⁵² PPAMAAPK	COOH		
Receptor de grelina 1 (GHSR1)	KL ³⁴⁹ T ³⁵⁰ LKDESSR	COOH	Endocitosis Reclutamiento de β-arrestina	Bouzo-Lorenzo et al., 2016
	AWTES ³⁶² SINT ³⁶⁶	COOH		
	AWTES ³⁶³ INT ³⁶⁶	COOH		

1.10. Proteínas asociadas a GPCRs.

Luego de la su activación, los GPCRs pueden llevar a cabo cambios conformacionales que favorecen interacciones entre sus dominios intracelulares y moléculas señalizadoras tales como las subunidades de las proteínas G y β-arrestinas (Kobilka, 2013; Thomsen et al., 2016). La señalización normal o fisiológica de los GPCRs depende de las moléculas con las que el receptor interacciona. De hecho, las modificaciones post-traduccionales mencionadas previamente pueden inducir cambios en la estructura terciaria y formación de complejos (Xin et al., 2012), los cuales regulan la asociación con otras moléculas y funcionan como puente de unión entre las funciones diferenciales de las mismas

(Venkatakrishnan et al., 2013; Li et al., 2014). De tal modo que, entender la regulación de receptores y caracterizar su estructura y dinámica, así como las proteínas con las que interacciona sería de gran utilidad en el diseño de fármacos con GPCRs como blanco terapéutico.

Debido al tamaño relativamente largo del carboxilo terminal del receptor α_{1D} , que tiene la menor homología entre los subtipos de la familia α_1 , existe un gran interés en encontrar proteínas asociadas con esta región. Además, la diversidad y tamaño de su tercera asa intracelular (IL3) también es atractiva, sumado a su participación en el acoplamiento con la proteína G. Las proteínas que se ha reportado que interaccionan con el receptor α_{1D} se muestran en la Tabla 3, así como su función, el posible rol relacionado a la regulación del receptor y la metodología que se usó para detectarlas.

Tabla 3. Proteínas asociadas al receptor α_{1D} adrenérgico.

Proteín	Función	Posible rol en GPCR	Método	Referencia
Receptor α_{1B}	Receptor acoplado a Gq	Localización en membrana	Microscopía confocal	Hague et al., 2004 Hague eta al., 2006
gC1qR	Proteína del complemento	Desconocido	IP-WB	Pupo et al., 2003
nNos	Óxido nítrico sintasa neuronal	Desconocido	IP-WB	Pupo et al., 2002
Filamina C		Desconocido	Doble híbrido	Zhang et al., 2004
SNTB Sintrofina β_1 y β_2	Proteína de unión a actina	Proteína adaptadora	MS IP-WB	Lyssand et al., 2008
UTRN Utrofina	Componente de citoesqueleto	Proteína adaptadora	MS IP-WB	Lyssand et al., 2008
ERLIN1 y 2 ER asociada a balsas lipídicas 2	Asociada a retículo endoplásmico	Desconocido	MS IP-WB	Lyssand et al., 2008
GOPC	Asociada a Golgi	Proteína adaptadora	MS IP-WB	Lyssand et al., 2008
DTNA, Distrobrevina	Proteína citoplásmica; unión a sintrofina	Proteína adaptadora	MS	Lyssand et al., 2008
SNTA1, Sintrofina 1	Proteína de unión a actina, asociada a distrofina	Proteína adaptadora	IP-WB	Boisguerin et al., 2004 Lyssand et al., 2008
LNx1	Ligando de numb x, E3 ligasa de ubiquitina	Desconocido	Doble híbrido	Guo et al., 2012
ACTA2	Actina 2, músculo liso	Motilidad celular	MS	Lyssand et al., 2008
AMFR	Receptor de factor de motilidad autocrina	Tráfico de membrana	MS	Lyssand et al., 2008

Proteín	Función	Posible rol en GPCR	Método	Referencia
CKAP4	Proteína asociada a citoesqueleto	Motilidad celular	MS	Lyssand et al., 2008

Por ejemplo, se ha descrito que los receptores adrenérgicos α_{1D} y α_{1B} pueden interactuar y formar heterodímeros. Al ser co-expresados, el subtipo α_{1D} pasa de estar mayoritariamente en vesículas intracelulares a trasladarse a la superficie celular (Hague et al., 2004b). Los autores sugieren que el núcleo hidrofóbico del receptor α_{1B} actúa como chaperona para su inserción en la membrana plasmática del α_{1D} . La heterodimerización de los receptores α_{1D} y α_{1B} es un claro ejemplo de la función asociada a la interacción. Por otro lado, también se ha reportado que la proteína multifuncional gC1qR interactúa con un motivo de poli-argininas del receptor α_{1B} , y que esta proteína modula su expresión y localización subcelular (Xu et al., 1999). El motivo de poliargininas también está presente en la región carboxilo del receptor α_{1D} y se ha demostrado que gC1qR y estos receptores coimmunoprecipitan, es decir, forman parte del mismo complejo proteína-proteína (Pupo et al., 2003). Sin embargo, queda por determinar el papel funcional de esta interacción.

Finalmente, diversos autores (Chen et al., 2006, Lyssand et al., 2008 y 2011) han demostrado que a través de su motivo PDZ en la región carboxilo, el receptor α_{1D} interactúa con proteínas adaptadoras de unión al citoesqueleto llamadas distrofinas: sintrofina, distrobrevina y utrofina. Por un lado, esta interacción favorece la estabilidad y expresión del receptor en la membrana plasmática. Por otro, abolir dicha interacción en músculo liso de aorta resulta en una pérdida de la función del receptor (Lyssand et al., 2008). De hecho, en este proceso están involucradas proteínas que no interactúan directamente con el receptor, como la α -catulina (Lyssand, et al., 2010), que es reclutada por la distrobrevina y otras moléculas que forman parte de un gran complejo de señalización (Constantin, 2014).

Las interacciones de proteínas arriba mencionadas, fueron caracterizadas al utilizar la tecnología de espectrometría de masas. Llama la atención que sólo para un número reducido de casos se han validado dichas interacciones y se ha demostrado la repercusión funcional. Por tal motivo, es posible utilizar la tecnología de espectrometría de masas, no solo para identificar interacciones proteína-proteína, sino para encontrar relaciones estructura/función de proteínas como GPCRs.

2. JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio estamos interesados en conocer los mecanismos moleculares que median la regulación negativa de las señales emitidas por los receptores acoplados a proteínas G durante su activación sostenida. Si bien se ha caracterizado a detalle la desensibilización del prototipo de la familia de receptores para noradrenalina, el β_2 -adrenérgico (Doronin et al., 2000; Nobles et al., 2011; Gao et al., 2014), se conoce poco sobre la regulación del subtipo α_{1D} durante este proceso fisiológico. De hecho, el receptor α_{1D} es considerado el menos estudiado de los nueve miembros de la familia de adrenérgicos.

En nuestro grupo se ha descrito que el receptor α_{1D} es una fosfoproteína y que su estado de fosforilación está asociado tanto a desensibilización mediada por noradrenalina (homóloga) como por factores no relacionados (heteróloga) (García-Sáinz et al., 2000, 2001 y 2004). Respecto a la participación de dominios específicos del receptor en su regulación el conocimiento es limitado, puesto que a la fecha no se ha resuelto la estructura cristalográfica, ni se conocen los sitios de fosforilación del mismo. Además, sólo se han publicado dos mutantes con propiedades estructura/función de este subtipo (Hague et al., 2004). Como ya se mencionó, en una de estas mutantes descrita por nuestro grupo, se determinó que la región carboxilo del receptor es dispensable para su actividad y desensibilización. Lo anterior fue descubierto al evaluar la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} (Rodríguez-Pérez et al., 2009a). Sin embargo, no se ha estudiado a detalle la regulación mediada por dominios específicos del receptor en otras vías de señalización, como las MAPKs, o su repercusión en el tráfico vesicular.

Por otro lado existen reportes que muestran que la tercera asa intracelular es indispensable en la función de otros GPCRs, como el receptor del polipéptido intestinal vasoactivo y el receptor muscarínico M_3 (Langer et al., 2005; Wang et al., 2005; Torrecilla et al., 2007). Es importante mencionar que la tercera asa del receptor α_{1D} es particularmente larga (79 aminoácidos) en comparación con otros GPCRs. Por lo que se sugiere que también esta región pudiera estar involucrada en la regulación.

Finalmente, existe un gran interés en el estudio del receptor α_{1D} adrenérgico debido a que su función se ha relacionado con el mantenimiento en la presión arterial. Se ha descrito que los ratones *knockout* de este receptor son hipotensos (Tanoue et al., 2003), por lo que la desregulación del receptor α_{1D} se ha asociado también con la patogénesis de la hipertensión, un problema de salud pública a nivel mundial.

3. HIPÓTESIS

La región carboxilo terminal y la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} participan en su función y desensibilización.

- La región carboxilo terminal del receptor α_{1D} participa en la regulación de las vías de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{++} y ERK.
- Los dominios intracelulares del receptor α_{1D} , se fosforilan con patrones diferenciales durante la desensibilización en respuesta a noradrenalina y a estímulos no relacionados y esto le confiere al receptor propiedades de señalización particulares.

4. OBJETIVO

General:

Estudiar la participación de la región carboxilo terminal y la tercera asa intracelular en la función del receptor α_{1D} adrenérgico humano.

Particulares:

- Caracterizar el mecanismo de activación de ERK1/2 mediado por el receptor α_{1D} adrenérgico en células Rat-1, manera particular, el rol de PKC.
- Estudiar el papel de la región carboxilo y la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} adrenérgico en la activación de la vía de la MAPK/ERK en las líneas celulares Rat-1, HEK293 y B103.
- Realizar un análisis *in silico* del receptor α_{1D} para obtener:
 - Sitios probables de fosforilación.
 - Cinasas.
 - Modelo tridimensional.
 - Motivos reguladores.
- Purificación del receptor y análisis de espectrometría de masas para:
 - Determinar su secuencia de aminoácidos.
 - Identificar nuevas proteínas asociadas.
 - Determinar los sitios de fosforilación del receptor α_{1D} en su estado basal, así como durante su desensibilización homóloga y heteróloga.
- Generar mutantes de los sitios de fosforilación del receptor α_{1D} y caracterizar su repercusión funcional a los siguientes niveles:
 - Perfil de fosforilación.
 - Desensibilización de la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} .
 - Activación de la vía de MAPK/ERK.
 - Localización subcelular.
 - Tráfico vesicular/internalización.
- Identificar las cinasas que median la fosforilación del receptor α_{1D} durante desensibilización homóloga y heteróloga.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos.

NA ((-)-Noradrenalina), LPA (ácido lisofosfatídico) [oleoyl (C18: 1,[cis]-9) (oleoyl-sn-glycero-3-phosphate)], PMA (miristoil forbol acetato), EGF (Factor de crecimiento epidérmico), propanolol, prazosina, yohimbina, bacitracina, inhibidor de tripsina, leupeptina, Hepes, pirofosfato de sodio, fluoruro de sodio, cloruro de magnesio, EDTA (Ácido Etilén-di-amino-tetra-acético), PMSF (Fluoruro de Fenil Metil Sulfonilo), SDS (Dodecil sulfato de sodio), Tritón X-100, Nonidet P-40, higromicina, polybrene, paraformaldehído, de Sigma Aldrich; Gö6976 y BIM (bisindolilmaleimida) de Calbiochem. El medio modificado Dulbecco's Eagle (DMEM), el antibiótico G418, el suero fetal bovino y otros reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Thermo Fisher. Fura-2AM acetometil ester fue de Molecular Probes. La proteína A agarosa y el luminol fueron de Millipore. Los kits de extracción de plásmido y la Lipofectamina 2000 fueron de Invitrogene. El GenJet de SignaGen Laboratories. Los plásmidos pEGFP-N1, pEGFP-C1, pDsRed Monómero N-1 se obtuvieron de Clontech. El plásmido pS-001 fue donado por el Dr. Jerold Chun. Las enzimas de restricción BamHI, EcoRI y NheI fueron de Roche. El plásmido de subclonación pGEM-T fue de Promega. El plásmido pGEX-2T fue de GE Healthcare. El plásmido pEKAR se obtuvo de Addgene. El plásmido pCEFL-HA-RA α_{1D} Δ 1-79 se generó previamente en el laboratorio (Rodríguez-Pérez et al., 2004a). La DNA polimerasa Pfx50 fue de Thermo Fisher Scientific. Los anticuerpos anti ERK1/2 total (p42/44), fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), MEK total, fosfo-MEK (Ser217/Ser221), c-Raf-1 total, fosfo-c-Raf-1 (Ser338) se obtuvieron de Cell Signaling Technology. El anticuerpo anti ERK2 total (p42) fue de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo monoclonal anti GFP de *Aequorea victoria* se obtuvo de Becton Dickinson. El anticuerpo policlonal dirigido contra la GFP fue generado en el laboratorio (Avedaño-Vázquez et al., 2005).

5.2 Cultivo celular.

Las líneas celulares Rat-1 (fibroblastos de rata), B103 (neuroblastoma de rata), HEK293 (células embrionarias de riñón humano) y Φ NX (células productoras de retrovirus; HEK293 modificadas) fueron crecidas en medio DMEM suplementados con 10 % de suero fetal bovino, estreptomina 100 μ g/mL, penicilina 100 U/mL y anfotericina B 0.25 μ g/ml. Las células se incubaron en condiciones standard (37 °C, 5 % de CO₂ y a una atmósfera saturada de humedad).

5.3 Construcción y análisis de plásmidos.

Los plásmidos p Δ N-GFP y p Δ N Δ C-GFP se obtuvieron mediante subclonación por PCR (Mutagenex). Para el p Δ N-GFP (α_{1D} Δ 1-79), se amplificó el inserto a partir de pCEFL-HA-RA α_{1D} Δ 1-79 (Rodríguez-Pérez 2004a) con los siguientes oligonucleótidos: Sentido: 5'-AAAAAGCTAGCCACCATGGACGTGAATGGCACGGCGG-3' Antisentido: 5'-AAAAAGAATTTCGAATATCGGTCTCCCGTAGGTTGC-3'. Para el p Δ N Δ C-GFP se amplificó el inserto a partir de pCEFL-HA-RA α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572. En ambos casos se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5'-AAAAAGCTAGCCACCATGGACGTGAATGGCACGGCGG-3'.
Antisentido: 5'-AAAAAGAATTTCGGGCCCGCCAGTGGTGGCC-3'. Los dos amplicones arriba mencionados fueron ligados entre los sitios NheI y EcoRI del plásmidos pEGFP-N1.

Los plásmidos del sistema de expresión inducible Flp-In T-rex: p Δ N-GFP-Trex y p Δ N Δ C-GFP-Trex, se obtuvieron al amplificar los fragmentos del receptor α_{1D} adrenérgico Δ 1-79-GFP y Δ 1-79 Δ 440-572-GFP. En los plásmidos anteriores se realizaron las siguientes mutaciones: S300/323/331/332/334A/T328V, para generar las construcciones p Δ N-3 Δ L-GFP-Trex y p Δ N Δ C-3 Δ L-GFP-Trex. Los amplicones fueron ligados entre los sitios HindIII y NotI del plásmido pcDNA5/FRT/TO (Mutagenex).

Las secuencias de cDNA correspondientes a la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} humano silvestre (IL3Wt); la tercera asa intracelular con las mutaciones puntuales: S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A (IL3S/A) y la tercera asa celular intracelular con las mutaciones S283D, S287D, S300D, S323D, S331D, S332D, S334D, S341D (IL3S/D) se sintetizaron químicamente (Genscript). Para generar proteínas de fusión con GFP, los insertos anteriores fueron subclonados de manera direccional en los sitios EcoRI y BamHI del plásmido pEGFP-C1. Para generar proteínas de fusión con GST, los insertos antes descritos fueron subclonados de manera direccional (Genscript) entre los sitios BamHI y EcoRI del plásmido pGEX-2T.

Los plásmidos del sistema de expresión retroviral Phoenix: p Δ N-GFP-S001, p Δ N Δ C-GFP-S001, p Δ N-3 Δ L-GFP-S001, p Δ N Δ C-3 Δ L-GFP-S001 y pIL3WT-S001, se generaron al amplificar los fragmentos del receptor α_{1D} adrenérgico Δ 1-79-GFP, Δ 1-79 Δ 440-572-GFP, Δ 1-79-3 Δ L-GFP, Δ 1-79 Δ 440-572-3 Δ L-GFP y 276-348-GFP. Los productos de amplificación de PCR fueron ligados en pGEM-T, posteriormente fueron subclonados entre los sitios BamHI y EcoRI del plásmido pS001. Para obtener las construcciones p Δ N-IRES-GFP-S001, p Δ N Δ C-GFP-IRES-S001, p Δ N-3 Δ L-IRES-GFP-S001, p Δ N Δ C-3 Δ L-

IRES-GFP-S001 se amplificaron los fragmentos del receptor α_{1D} $\Delta 1-79$, $\Delta 1-79 \Delta 440-572$, $\Delta 1-79-3\Delta L$ y $\Delta 1-79 \Delta 440-572-3\Delta L$ y se ligaron en pGEM-T, luego fueron insertados entre los sitios BamHI y EcoRI del plásmido destino pIRES-GFP-S001.

Los plásmidos p ΔN -dsRed y p $\Delta N\Delta C$ -dsRed se generaron al digerir p ΔN -GFP y p $\Delta N\Delta C$ -GFP con NheI y EcoRI e insertar los fragmentos entre los mismo sitios de pDsRed-Monomer-N1. Todas las construcciones obtenidas fueron purificadas mediante mini preparaciones comerciales, secuenciadas (Genewiz) y sometidos a análisis de restricción para corroborar su identidad. Para ver una lista de todas las construcciones generadas en esta tesis, referirse al Anexo I.

5.4 Transfección transitoria.

Las células HEK293 α_{1D} ΔN y $\Delta N\Delta C$ se sembraron en cajas de 10 cm de diámetro. Una vez alcanzada una confluencia del ~80 %, las células fueron transfectadas con 3 μ g de plásmido y 28.5 μ L de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) o polietilenimina, en un volumen final de 3 mL de Optimem sin suero y sin antibiótico. Se incubaron durante 4 h con la mezcla anterior y transcurrido el tiempo se reemplazó por medio DMEM suplementado con suero y antibióticos. Los experimentos se realizaron transcurridas 48 o 72 h después de la transcripción.

5.5 Generación de líneas celulares estables resistentes a geneticina (G418).

Se transfectaron células Rat-1 y B103 silvestres (Wt), como se describió previamente, con los plásmidos que codifican para las distintas mutantes del receptor y que contienen un gen de resistencia a geneticina. Para generar las líneas estables, se cultivaron las células con medio DMEM suplementado con el antibiótico G418 (600 μ g/mL) durante 3 semanas. Transcurrido dicho tiempo, se cambió la concentración de G418 a 300 μ g/mL. En las células seleccionadas, resistentes al antibiótico, se analizó la generación de segundos mensajeros (como calcio intracelular) la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la estimulación con noradrenalina (Ver anexo II).

5.6 Generación de líneas celulares estables: sistema inducible Flp-In T-rex.

Se sembraron células parentales HEK293 Flp-In T-rex en cajas de 10 cm. Una vez alcanzada una confluencia del ~80 %, las células fueron cotransfectadas con los plásmidos pOG44 y pcDNA5/FRT/TO en una relación w/w de 6:1 y 20 μ L de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), en un volumen final de 3.5 mL de Optimem sin suero y sin antibiótico. Se incubaron con dicha mezcla durante 4 h, luego de las cuales se

reemplazó con medio DMEM suplementado con blasticidina 5 µg/mL. Cuarenta y ocho horas post transfección (hpt), las células se sembraron en placas de 6 pozos a una confluencia menor al 25%. Setenta y dos hpt se cambió se reemplazó el medio por DMEM con blasticidina 5 µg/mL e higromicina B 100 µg/mL. Se mantuvieron en el medio de selección hasta la aparición de colonias de células aisladas resistentes a los antibióticos. Se crecieron colonias aisladas para obtener distintas clonas, las cuales se indujeron durante 14-18 h con doxiciclina 1 µg/mL. Se evaluó la expresión del reportero GFP mediante microscopía de epifluorescencia (Ver Anexo II).

5.7 Determinación de Ca²⁺ intracelular.

Las células sembraron en cajas de 10 cm de diámetro. Una vez alcanzada una confluencia del ~80 %, las células fueron incubadas en DMEM sin suero y sin antibiótico durante toda la noche. Se lavaron dos veces con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) pH 7.3 y se incubaron durante 1 h a 37 °C con el indicador fluorescente Fura-2AM 5 µM en solución Krebs-Hepes-albúmina pH 7.4 (Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, albúmina 0.05 %, glucosa 10 mM, CaCl₂ 1.3 mM). Posteriormente, se lavaron las células dos veces con PBS y se despegaron mediante una incubación con tripsina durante 30 segundos. Se detuvo la reacción enzimática con solución Krebs-Hepes-albúmina. Las células se resuspendieron suavemente y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 3 min. Se desechó el sobrenadante y se repitió el lavado/centrifugación dos veces más. Las células se resuspendieron en Krebs-Hepes-albúmina en un volumen final de 5 mL. La medición de fluorescencia se llevó a cabo en un espectrofotómetro Aminco-Bowman Series 2 con los parámetros descritos (García-Sáinz et al., 2010).

5.8 Inmuno-ensayos tipo Western blot.

Para realizar estos experimentos, se sembraron células Rat-1 en placas de 6 pozos. Una vez alcanzada una confluencia del 80 %, se incubaron con DMEM sin suero durante toda la noche. Se siguió un curso temporal de estimulación con noradrenalina (NA) 10 µM, TPA 1 µM, ácido lisofosfatídico (LPA) 10 µM, factor de crecimiento epidérmico (EGF) 100 ng/mL, durante 1, 5 y 30 minutos. Una vez finalizada la incubación con los estímulos, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y lisadas con 150 µL de Laemmli 1X. Se recuperaron los lisados y se hirvieron durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron

a 12,000 rpm durante 5 min. Se corrieron 30 μ L de muestra en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10 % (SDS-PAGE). Las proteínas separadas mediante electroforesis, se electrotransfirieron en una cámara semiseca a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (BioRad). Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos en la membrana con leche descremada al 5% en TBS (solución amortiguadora con Tris) más Tween al 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave. Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS-Tween al 0.1% con albúmina al 1% para ERK2 total (1:1000) y al 5% para P-ERK1/2 (1:5000), MEK 2 total (1:5000) y P-MEK1/2 (1:2000). Con estas diluciones, los anticuerpos primarios se incubaron con la membrana durante toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-Tween al 0.1 % y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h. La señal de quimioluminiscencia se obtuvo al incubar las membranas con un reactivo comercial (SuperSignal West Pico Chemiluminescent, Thermo Scientific) por 5 min. Las bandas se visualizaron al revelar películas de autoradiografía (Kodak MXB). La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

5.9 Análisis de la actividad de ERK1/2 mediante FRET.

Se transfectaron las células Rat-1 $\alpha_{1D} \Delta$ 1-79 y Δ 1-79 Δ 441-572, como se describió previamente, con el plásmido reportero de la actividad de ERK1/2 (EKAR) (Addgene). 48 horas posteriores a la transfección, las células transfectadas se sembraron a una confluencia baja en cajas de 35 mm con fondo de vidrio. Al día siguiente, las preparaciones se observaron en un equipo confocal Olympus Fluoview FV1000 acoplado a un microscopio de luz invertido IX81. Se utilizó un objetivo de inmersión en glicerol 100x/1.3 NA. Luego de estimularse las células con ácido lisofosfatídico (LPA) 10 μ M la proteína verde fluorescente fue excitada a una longitud de onda de 488 nm y la emisión se capturó de manera simultánea en los canales de emisión, verde (500-530 nm) y rojo (555-655 nm). Todas las imágenes se obtuvieron con una apertura numérica de 1.3, el mismo porcentaje de láser y la misma ganancia. Los videos se obtuvieron al procesar las imágenes con los programas FluoView Application Software FV1000 y el software ImageJ.

5.10 Ensayo de reducción de MTT.

Para realizar el ensayo de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), las células se sembraron a baja confluencia en placas de 96 pozos. Se incubaron durante 2 h para favorecer la adhesión de las células. Luego de 1, 2, 3 y 4 h

de incubación en medio suplementado con suero fetal bovino al 10 %, se retiró el medio y se agregaron 100 μ L medio nuevo a 37°C y 50 μ L de MTT. Posteriormente las células se incubaron durante 2 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se retiró cuidadosamente el medio con MTT y los cristales formados por la reacción de óxido-reducción se disolvieron en 100 μ L de isopropanol. Finalmente esta solución de los cristales fue transferida a una placa de 96 pozos nueva, para leer las absorbancias a 570 nm en un lector de placas (Bio-Tek, ELx-800).

5.11 Fosforilación e inmunoprecipitación de la tercera asa intracelular y del α_{1D} AR.

Los protocolos se realizaron de acuerdo a lo reportado anteriormente por el laboratorio (Vázquez-Prado et al., 1997; Garcia Sáinz et al., 2001). Las células se sembraron en cajas de 6 pozos a confluencia y se ayunaron toda la noche en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, por su siglas en inglés) sin suero y sin fosfatos. Al día siguiente las células se marcaron con 50 μ Ci/mL de [32 P] Pi en medio DMEM sin suero y sin fosfatos durante 3 h a 37 °C. Se estimularon por 5 min con noradrenalina 10 μ M o el éster de forbol TPA 1 μ M. Se detuvo el estímulo al aspirar el medio y colocar las placas sobre hielo. Se lavaron dos veces con PBS frío. Se agregó 0.5 mL de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (PMSF, bacitracina, inhibidor de tripsina, leupeptina) y con inhibidores de fosfatasas (fosfo-tirosina, fosfo-treonina, fosfo-serina, β -glicerofosfato, NaF, Na₄P₂O₇, Na₄V₂O₇) por 1 h a 4 °C. Se obtuvieron los lisados y se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se inmunoprecipitó utilizando 10 μ L de antisuero de conejo anti GFP y 20 μ L de la proteína A agarosa; se incubaron a 4 °C durante toda la noche en agitación constante. Se centrifugaron las muestras y se lavaron 3 veces con buffer de lavado NaF, tritón 10% y SDS 1%. Se agregó a cada muestra 25 μ L de SDS 10% y 25 μ L de buffer Laemli 2X y se desnaturalizaron al hervirse durante 10 min. Se cargaron 25 μ L de cada muestra en geles de acrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes y se corrieron a 100 V. Los geles se secaron al vacío y fueron expuestos en placas de autorradiografía del sistema PhosphorImager (Molecular Dynamics) y se visualizaron mediante el Typhoon PhosphorImager y el programa ImageJ.

5.12 Ensayos de coimmunoprecipitación.

Las células HEK293 que sobre expresan de manera estable: GFP, GFP-IL3 Wt, GFP-IL3 S Δ A y GFP-IL3 S Δ D los fragmentos del α_{1D} AR o la GFP se sembraron en cajas de 10 cm hasta alcanzar un 80% de confluencia. Se lavaron dos veces con PBS y

posteriormente se agregó 1 mL de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (PMSF 100 μ g/mL, bacitracina 5 mg/mL, inhibidor de tripsina 100 μ g/mL) y con inhibidores de fosfatasa (fosfo-tirosina, fosfo-treonina, fosfo-serina, β -glicerofosfato 10 mM, NaF 50 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, $\text{Na}_4\text{V}_2\text{O}_7$ 100 μ M) por 1 h a 4 °C. Se obtuvieron los lisados y se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se obtuvo el sobrenadante y se inmunoprecipitó utilizando 20 μ L de antisuero de conejo contra la proteína verde fluorescente y 30 μ L de la proteína A agarosa durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Se centrifugaron las muestras y se lavaron 5 veces con buffer de lavado NaF, tritón 10% y SDS 1%. Se agregó a cada muestra 30 μ L urea 8M/SDS 10% y 30 μ L de buffer Laemli 2X y se desnaturalizaron al hervirse durante 10 min. Se cargaron 20 μ L de cada muestra en geles de acrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes y se corrieron a 100 V. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF y fueron sometidas a ensayos tipo western blot (como se describió previamente).

5.13 Análisis *in silico* del α_{1D} AR.

Para identificar sitios probables de fosforilación en el receptor y las cinasas responsables, se utilizó el programa GPS 2.0 (Group-based Prediction System) (X. Yao et al, 2008) y el servidor NetPhos 3.0. Para predecir la estructura terciaria del receptor, se introdujo la secuencia de aminoácidos en el programa SwissModel. La manipulación de la estructura 3D se realizó con el programa PyMol. Para identificar las proteínas asociadas al receptor y su secuencia, se utilizó el servicio de la Unidad de Espectrometría de masas de la Universidad de Harvard. El alineamiento de las secuencias del receptor α_{1D} humano con sus ortólogos, se llevó a cabo con la herramienta BLAST de NCBI.

5.14 Análisis de sitios de fosforilación mediante espectrometría de masas.

El receptor α_{1D} humano fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP), se sobre-expresó en células HEK293 utilizando el sistema T-Rex (Invitrogen). Se realizó una inmunoprecipitación masiva con la ayuda de antisueros anti GFP (generados en el laboratorio) acoplados a perlas de proteína A agarosa. Se corroboró la identidad de la proteína purificada al correr la muestra en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y mediante western blot con un anti cuerpo monoclonal anti-GFP (Clontech). La banda correspondiente al peso molecular esperado (110 kDa), se cortó y se analizó en la Unidad de Espectrometría de Masas de la Universidad de Harvard. Los experimentos de purificación y espectrometría de masas se realizaron por triplicado.

5.15 Análisis de internalización de receptores por microscopía confocal.

Las células HEK293 que expresaban de manera transitoria al receptor o las T-rex se sembraron a baja confluencia en cajas de fondo de vidrio. Luego de estimularse, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se observaron en un microscopio confocal Fluoview FV10i Olympus con un objetivo de inmersión en agua 60X. La GFP fue excitada a 480 nm y se detectó la fluorescencia emitida a 515-540 nm. La DsRed se excitó a 557 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 592 nm. Las imágenes se procesaron y se convirtieron a formato TIFF con el software ImageJ.

5.16 Análisis estadístico.

El análisis entre grupos se realizó utilizando un análisis de varianza y una prueba de Bonferroni posterior. Para dichos análisis se utilizaron las herramientas de estadística incluidas en el programa GraphPad Prism. En todas las comparaciones, el valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

Parte I: Caracterización de las propiedades de señalización del α_{1D} -AR truncado en su región carboxilo.

6.1 El α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo tiene señalización sesgada.

El primer objetivo de esta tesis fue determinar el papel de la región carboxilo del α_{1D} -AR en su señalización. Para lograrlo, utilizamos fibroblastos de rata (Rat-1) que expresan de manera estable dos mutantes del α_{1D} -AR. Por un lado, una línea que expresa al receptor truncado en su región amino ($\Delta 1-79$) para favorecer su expresión en la membrana plasmática (Pupo et al., 2003) (Fig. 5A). Por otro lado, una línea que expresa al receptor con la misma mutación en el amino, pero también truncado en su cola carboxilo ($\Delta 441-572$) para evaluar el papel de esta última (Fig. 5B y Anexo III). Las mutantes fueron nombradas ΔN y $\Delta N\Delta C$, respectivamente. Las líneas celulares fueron generadas previamente en el laboratorio y expresan de manera estable cantidades similares de receptores α_{1D} (Rodríguez-Pérez et al., 2009a).

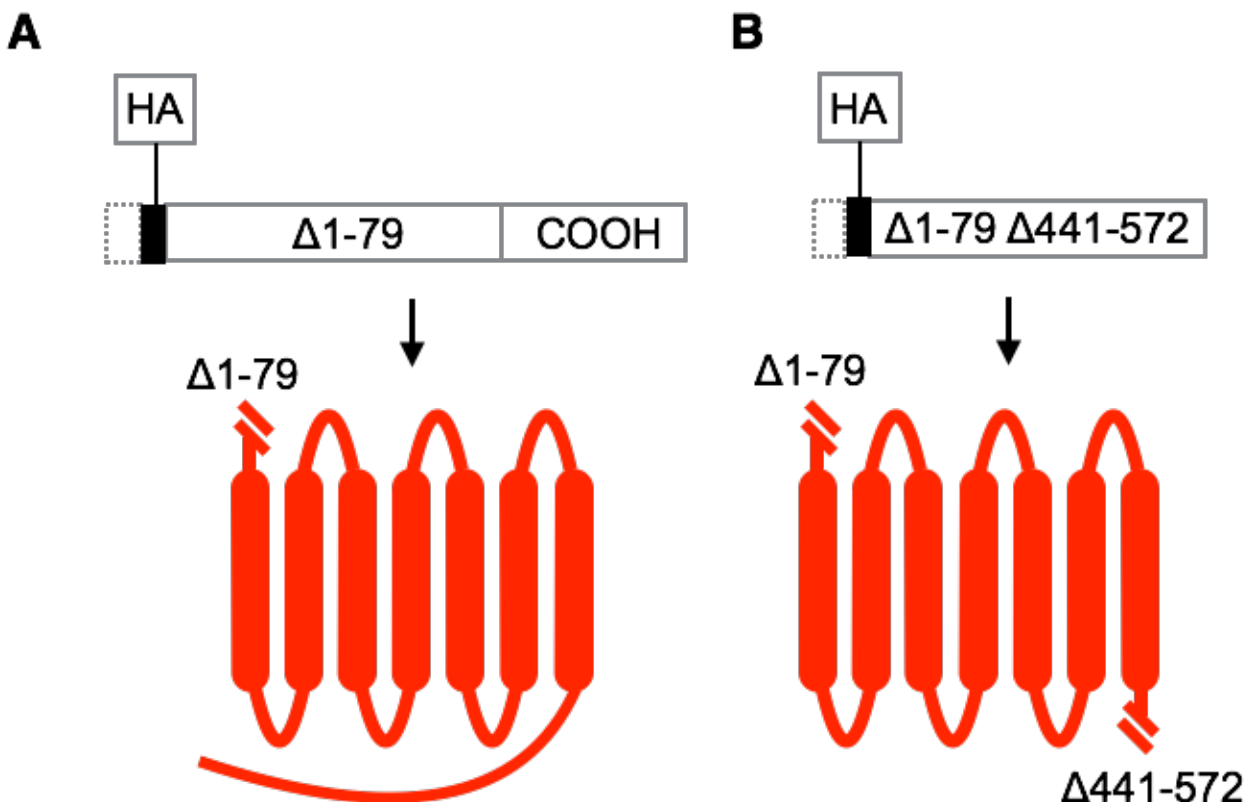


Figura 5. Representación de las mutantes del receptor α_{1D} -AR ΔN y $\Delta N\Delta C$. (A) Mutante ΔN : truncada en la región amino $\Delta 1-79$. (B) Mutante $\Delta N\Delta C$: truncada en la región amino $\Delta 1-79$ y carboxilo $\Delta 441-572$. HA. epítipo de hemaglutinina.

Primero, evaluamos la repercusión funcional de la región carboxilo del α_{1D} -AR en la activación de la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} . Para lo cual, estimulamos las células que expresan los receptores ΔN y $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ con su ligando natural, noradrenalina (NA), y posteriormente evaluamos la liberación de Ca^{2+} intracelular. En la figura 6A se observa que las células que expresan al receptor ΔN , incrementan los niveles de calcio de forma inmediata y transitoria (línea continua) en respuesta a NA. Por otro lado encontramos que, la respuesta máxima de liberación de calcio en las células que expresan al receptor $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$, es reproducible y comparable en magnitud con las ΔN (Fig. 6B, línea continua). Estos resultados indican que la región carboxilo no es necesaria para la activación de la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} .

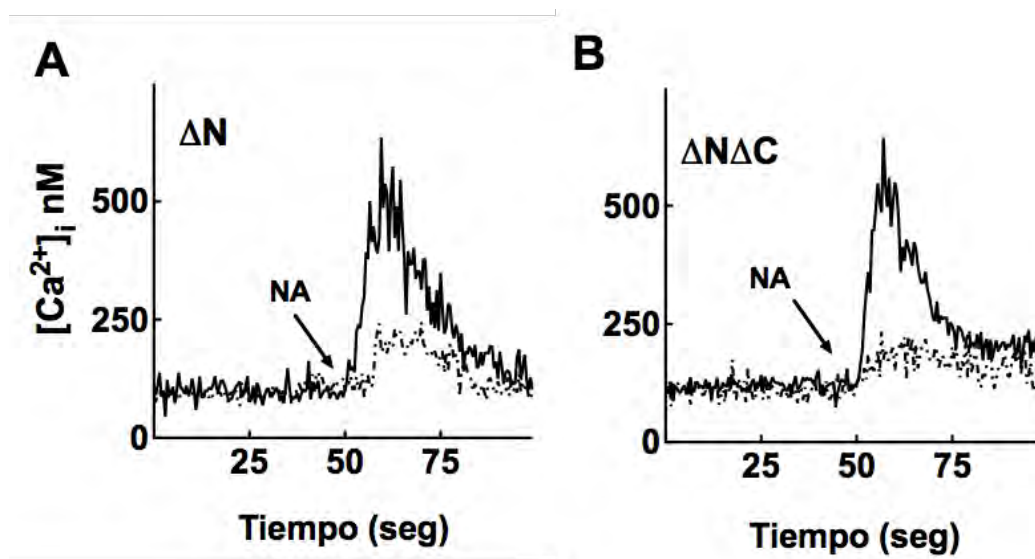


Figura 6. Repercusión funcional de la región carboxilo del α_{1D} -AR en la liberación de calcio intracelular. Determinaciones de calcio intracelular usando células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN (A) o $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ (B). Las células fueron estimuladas con noradrenalina (NA) $10 \mu\text{M}$ (flecha). Las células fueron preincubadas por 5 min en ausencia (línea continua) o en presencia (línea punteada) de forbol miristato acetato (PMA) $1 \mu\text{M}$.

Posteriormente, analizamos la participación de la región carboxilo en la atenuación de la señal del receptor mediada por factores no relacionados (desensibilización heteróloga). Los experimentos consistieron en incubar las células con el éster de forbol (PMA), para activar farmacológicamente a la proteína cinasa C (PKC). Después de esto, estimulamos las células con NA. En la línea celular que expresa al

receptor ΔN , observamos una disminución notable en la liberación de calcio en respuesta a NA (Fig. 6A, línea punteada). Es decir, el receptor ΔN se desensibilizó. Nuevamente, las células que expresan al receptor $\Delta N\Delta C$ tuvieron niveles máximos de liberación de calcio similares al control (Fig. 6B, línea punteada). Estos datos son consistentes con los publicados previamente en el laboratorio (Rodríguez-Pérez et al., 2009) y sugieren un mecanismo de desensibilización heteróloga independiente del carboxilo del α_{1D} -AR.

Con el objetivo de estudiar con mayor detalle la participación de la región carboxilo en las señales de calcio, se analizó la concentración de este segundo mensajero por tiempos prolongados. Después de estimular con noradrenalina las células que expresan el receptor ΔN , se observó la concentración de calcio intracelular llega rápidamente a su pico máximo y posteriormente tiende a sus niveles basales (Fig. 7A, línea continua). En las células $\Delta N\Delta C$, el pico máximo de liberación de calcio es similar al control (ΔN). Sin embargo, la concentración de calcio permanece por arriba del basal incluso 5 minutos después del estímulo con noradrenalina en las células que expresan la construcción truncada en el carboxilo (Fig. 7A, línea punteada). Se normalizaron los trazos de experimentos independientes tomando como 100% el pico máximo de liberación de calcio (Fig. 7B) y observamos la misma tendencia. Posteriormente se calculó el área bajo la curva de las gráficas obtenidas (Fig. 7C).

Determinamos que el área bajo la curva de las células ΔN es estadísticamente diferente respecto a la de las células $\Delta N\Delta C$. En otras palabras, en las células que expresan al receptor truncado en el carboxilo se encuentra alterada la recaptura de calcio.

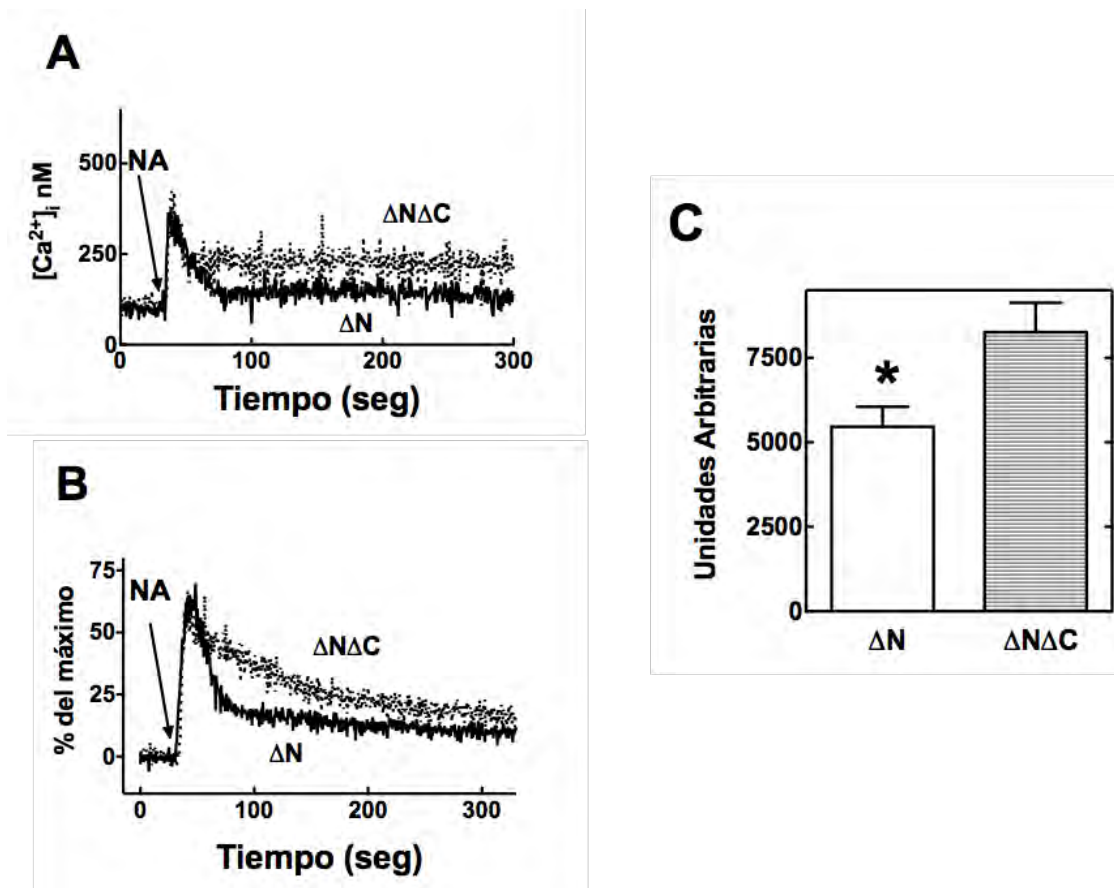


Figura 7. Implicación de la región carboxilo del α_{1D} -AR en la recaptura de calcio.

Determinaciones de calcio intracelular usando las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN (línea continua) o $\Delta N\Delta C$ (línea punteada). Las células fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μM (flecha). **(A)** Concentración de calcio intracelular **(B)** Valores de liberación de calcio normalizados respecto al máximo (100%). **(C)** Área bajo la curva durante 300 seg luego de alcanzar el máximo de liberación. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 5 a 8 determinaciones usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.01$ vs $\Delta N\Delta C$.

Después, estudiamos otra de las vías activadas por el α_{1D} -AR: la vía de ERK. Para esto, se evaluó fosforilación de ERK 1/2. La detección se realizó por medio de inmunoensayos tipo Western blot en extractos totales de células estimuladas durante 1, 5 y 30 min con NA (Fig. 8, lado izquierdo). En las células ΔN , se observó un incremento en la fosforilación de ERK (p-ERK1/2) luego de 1 min de estímulo con el agonista. La respuesta máxima se observó a los 5 min y luego de 30 minutos, los niveles de p-ERK 1/2 fueron similares al basal. Por otro lado, en las células que expresan el receptor $\Delta N\Delta C$, se observó un importante bloqueo en la fosforilación de ERK en todos los tiempos analizados durante el curso temporal (Fig. 8, lado derecho). La disminución de la fosforilación de ERK en estas células en respuesta a noradrenalina fue tal, que fue imposible realizar las densitometrías para estos experimentos.

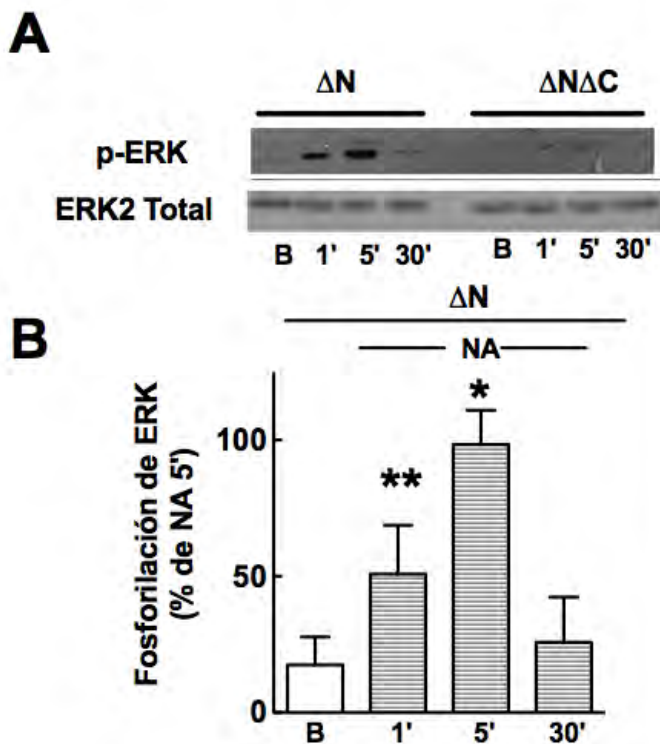


Figura 8. Efecto de noradrenalina en la fosforilación de ERK. (A) Las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN (izquierda) o $\Delta N\Delta C$ (derecha) fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μM por 1, 5 y 30 min. La respuesta de las células que expresan el receptor ΔN se normalizaron respecto al máximo observado (NA, 5 min) considerado como 100%. No se presentan datos cuantitativos de la respuesta en las células $\Delta N\Delta C$ porque fue muy pequeña y en la mayoría de los casos ausente. **(B)** Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.05$ vs basal.

Para descartar la participación de receptores adrenérgicos endógenos en las observaciones antes descritas, se evaluó funcionalmente su posible expresión. Estimulamos las células Rat-1 silvestres (no transfectadas) con NA y no detectamos fosforilación de ERK. Luego utilizamos antagonistas de los receptores α_1 -, α_2 - y β adrenérgicos (prazosina, yohimbina o propanolol, respectivamente). Tampoco observamos un efecto en la fosforilación de ERK en presencia de los antagonistas antes mencionados o luego de recibir un estímulo con NA. Sólo se detectó la fosforilación de ERK en el control positivo, al activar los receptores endógenos de ácido lisofosfatídico (LPA). Con esto confirmamos que las células Rat-1 no expresan receptores adrenérgicos endógenos.

En conjunto los resultados de esta sección indican la activación diferencial de las vías de señalización en dos mutantes del α_{1D} -AR. Por un lado, el receptor ΔN activa tanto la vía de ERK como la de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} , mientras que la mutante truncada en la cola carboxilo ($\Delta N\Delta C$) activa principalmente esta última vía. Es decir, describimos una mutante del receptor con señalización sesgada.

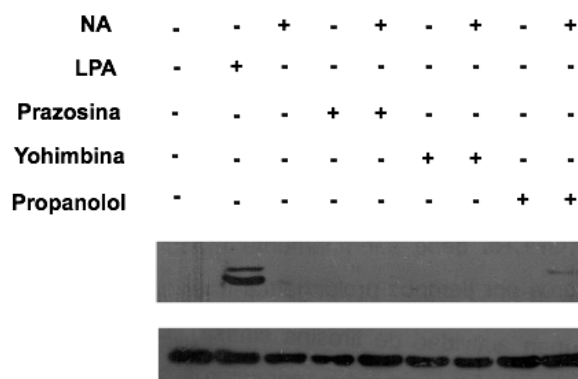


Figura 9. Las células Rat-1 silvestres no expresan receptores adrenérgicos endógenos. Las células Rat-1 silvestres (no transfectadas) fueron incubadas con noradrenalina (NA) 10 μ M por 5 min en ausencia o presencia de prazosina 1 μ M, yohimbina 1 μ M o propanolol 1 μ M. Las células se incubaron con ácido lisofosfatídico (LPA) 1 μ M por 5 min como control positivo. El experimento se repitió 3 veces con los mismos resultados usando diferentes preparaciones celulares. Se muestra un Western blot representativo de fosfo-ERK1/2 y ERK2 total.

6.2 El α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo inhibe la vía de ERK.

Para continuar con la caracterización de la señalización sesgada de las mutantes del α_{1D} -AR, medimos la fosforilación de ERK en respuesta a otros agonistas que activan la vía de las MAPKs cuyos receptores se expresan de manera endógena en las células Rat-1. Primero, analizamos la respuesta a ácido lisofosfatídico (LPA) que, al igual que la noradrenalina, se une a receptores acoplados a proteína G_q . También probamos la respuesta a agonistas que se unen a receptores con actividad de tirosina cinasa. Para lo anterior, estimulamos las células con el factor de crecimiento epidérmico (EGF). En las células que expresan al receptor ΔN , se observó una cinética típica de activación de ERK en respuesta a LPA. Es decir, la fosforilación de ERK incrementó luego de 1 min de estimulación con LPA (Fig. 10A). La activación de ERK tuvo su pico máximo a los 5 min y fue similar en magnitud a la activación mediada por NA (control positivo). Luego de 30 min, la fosforilación de ERK volvió a niveles similares al basal (Fig. 10A). Las células ΔN tuvieron la misma cinética de activación de ERK en respuesta EGF (Fig. 10B). De manera sorpresiva, no detectamos fosforilación de ERK en las células que expresan la mutante $\Delta N\Delta C$ al estimularlas con LPA o con EGF (Fig. 10A y B). Lo anterior se observó en todos los tiempos evaluados durante el curso temporal.

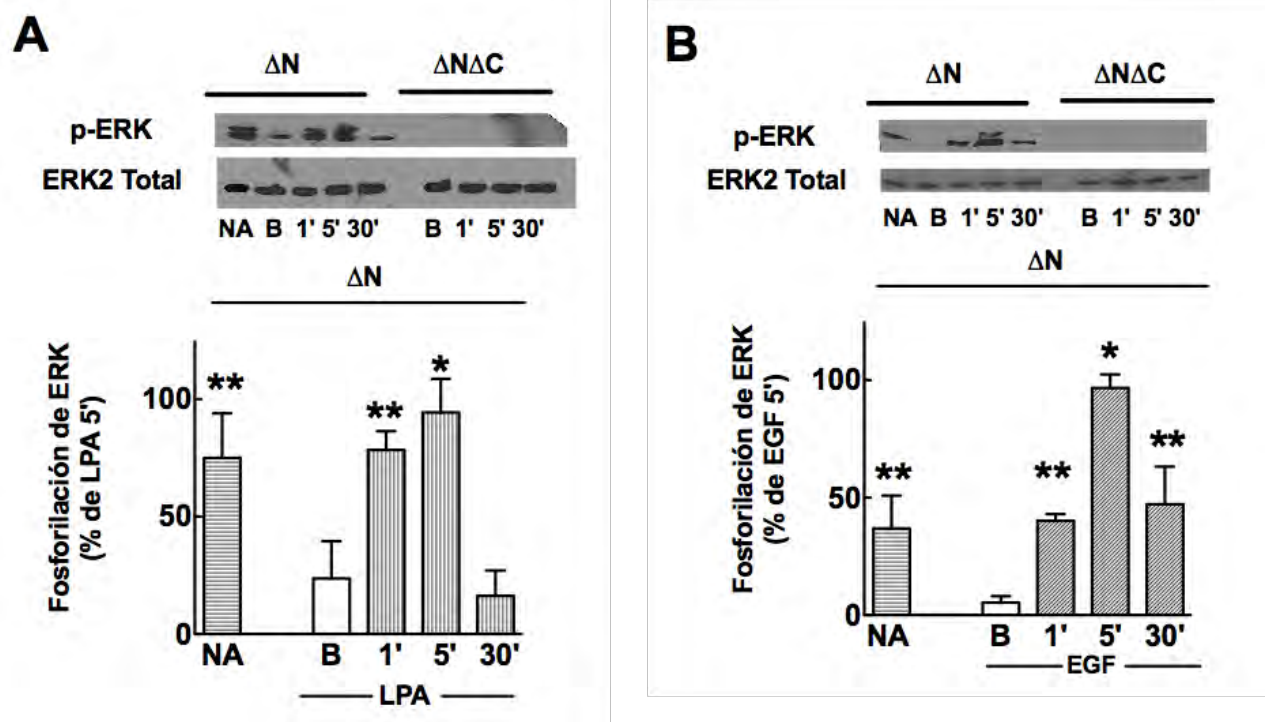


Figura 10. Efecto del ácido lisofosfatídico y el factor de crecimiento epidérmico en la fosforilación de ERK. (A) Las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN o $\Delta N\Delta C$ fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μM por 5 min (control positivo) o con ácido lisofosfatídico (LPA) 1 μM por 1, 5 y 30 min. La respuesta de las células que expresan el receptor ΔN se normalizaron respecto al máximo observado (LPA, 5 min) considerado como 100%. B indica niveles basales. (B) Se realizaron los experimentos como en (A) pero utilizando EGF 100 ng/mL en el curso temporal y los efectos fueron normalizados respecto al máximo (EGF, 5 min). No se presentan datos cuantitativos de la respuesta en las células $\Delta N\Delta C$ porque fue muy pequeña y en la mayoría de los casos ausente. En ambos paneles, se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 3-4 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.001$ vs basal; ** $p < 0.01$ vs basal.

La actividad de ERK tiene una compleja dinámica espacio temporal, que es importante para la especificidad de los efectos río abajo de la cascada de señalización. Hasta ahora se ha estudiado la actividad de ERK mediante técnicas bioquímicas, las cuales, pese a proporcionar información valiosa, presentan una visión estática de la señalización. Por tal motivo, decidimos comprobar con otra metodología los efectos diferenciales en la activación de ERK en las células ΔN y $\Delta N\Delta C$. Para lo anterior, estandarizamos el uso de un sensor específico de la actividad de ERK1/2 basado en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Este sensor es una proteína quimérica que contiene: 1) dos proteínas fluorescentes capaces de llevar a cabo transferencia de energía (EGFP y mRFP), 2) un dominio de unión a ERK 3) un péptido que es sustrato específico de ERK, 4) un dominio de unión a residuos fosforilados

(dominio WW) (Fig. 11). Al activarse la vía de ERK, ésta fosforila a sus sustratos naturales, pero también la treonina 48 del péptido sustrato contenido en el sensor. Esta modificación genera un incremento de afinidad entre el sustrato y el dominio WW. La unión entre estos dos dominios causa un cambio de conformación que permite el acercamiento de las proteínas fluorescentes de los extremos (Fig. 11). Esto favorece la transferencia de energía entre el donador (EGFP) y el aceptor (mRFP) (Harvey et al., 2008). Por lo que esta técnica permite analizar la activación de la vía de ERK en tiempo real y la localización espacial de la actividad de la cinasa.

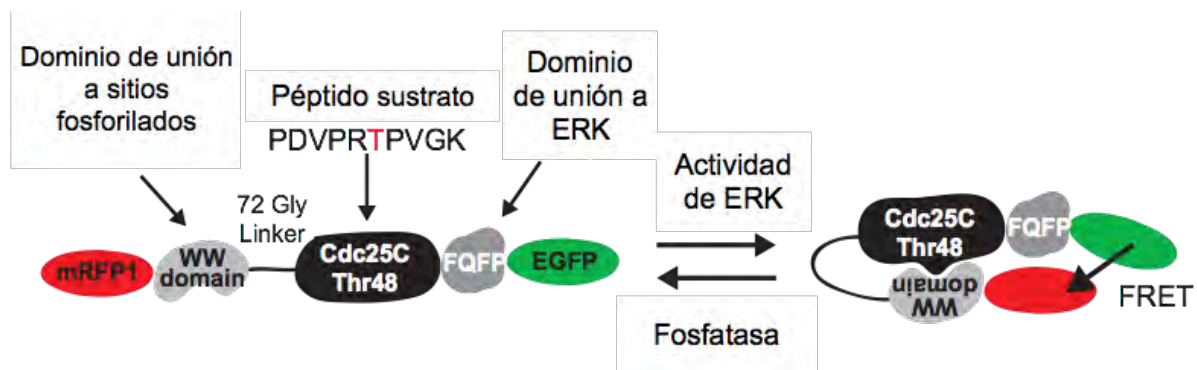


Figura 11. Representación gráfica del sensor de ERK basado en FRET. ERK activa fosforila al sensor y genera un cambio de conformación que incrementa la cercanía entre el fluoróforo donador (EGFP) y aceptor (mRFP). mRFP: proteína roja fluorescente; dominio WW: de unión a fosfo treonina; Cdc25c Thr48: péptido sustrato; FQFP: dominio de unión a ERK; EGFP: proteína verde fluorescente; FRET: transferencia de energía de resonancia de Förster. Tomada de Harvey et al., 2008.

Para realizar los experimentos de actividad de ERK mediante FRET, transfectamos transitoriamente las células ΔN y $\Delta N\Delta C$ con el plásmido que codifica para el sensor. Luego de 48 horas post-transfección, observamos las células vivas mediante un microscopio confocal. Detectamos la presencia del sensor en ambas líneas celulares al excitar la GFP (Fig. 12A y B, primera columna). De manera simultánea mantuvimos abierto el canal de detección de RFP. En las condiciones basales (LPA-) no observamos fluorescencia en este canal (Fig.12A y B, segunda columna). Posteriormente, estimulamos las células con LPA (+LPA) y grabamos los cambios en la fluorescencia de los canales GFP y RFP. En las células ΔN , la activación se reflejó en la disminución de la fluorescencia de GFP y en la aparición de señal de mRFP (Fig. 12A, segunda columna). Esta señal apareció como un patrón punteado en el citoplasma luego de pocos segundos de agregar el estímulo y permaneció los 5 min que capturamos las imágenes. Los puntos más intensos se aprecian incluso al empalmar los canales GFP/RFP (merge, tercera columna). Por el contrario, no observamos el encendido de ERK en las células

que expresan el receptor $\Delta N\Delta C$ (Fig.12B, segunda columna). Estas observaciones son consistentes con nuestros datos previos y comprueban que la mutante carente de la región carboxilo no activa ERK en respuesta a su agonista, ni al estimular otros receptores. Por lo que determinamos que esta mutante se comporta como dominante negativa para la vía de ERK.

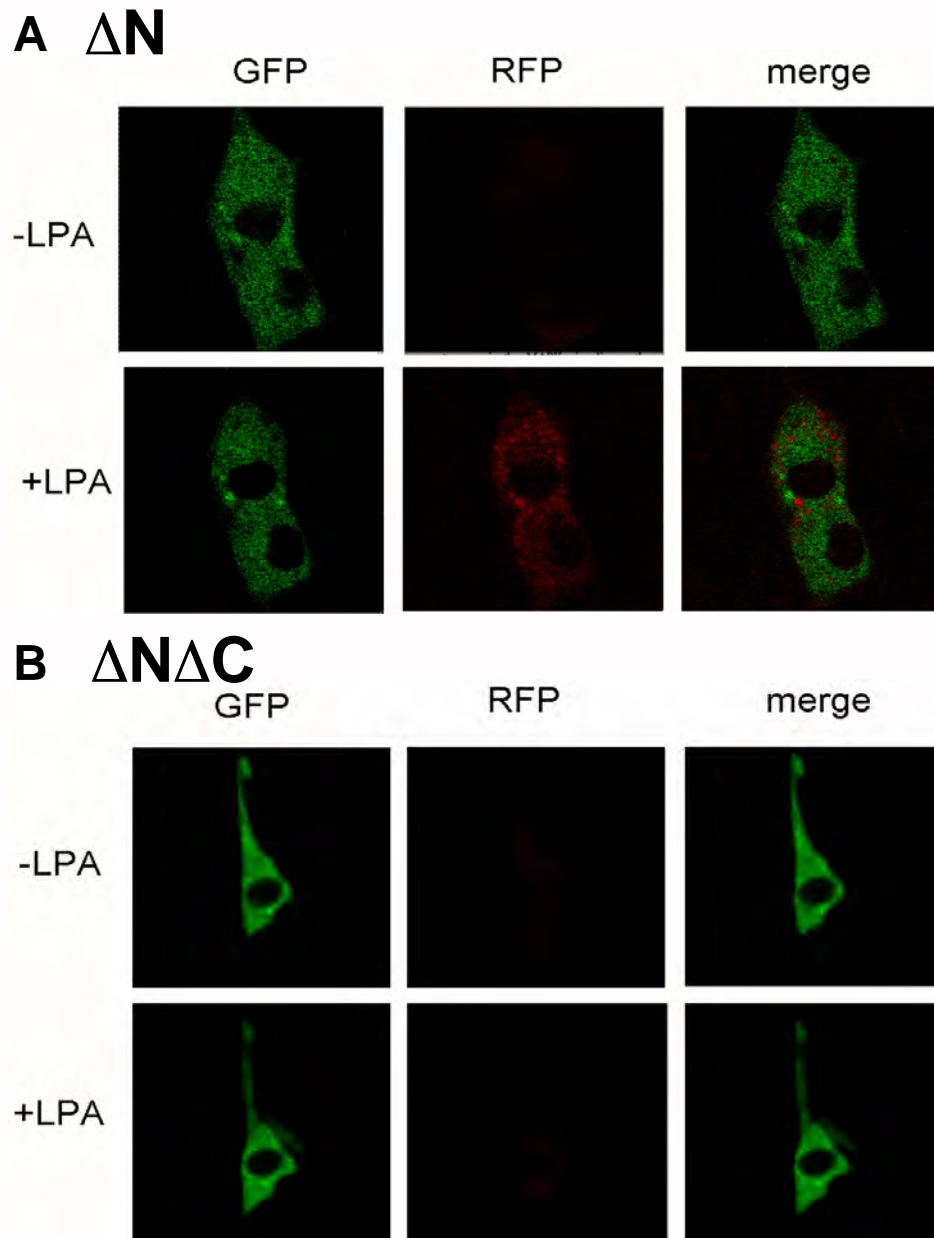


Figura 12. Efecto del ácido lisofosfatídico en la fosforilación de ERK detectada con un sensor basado en FRET. (A) Las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN o $\Delta N\Delta C$ **(B)** fueron transfectadas con el sensor y estimuladas con ácido lisofosfatídico (LPA) 1 μ M durante 5 min. Posteriormente fueron observadas mediante un microscopio confocal. La excitación se realizó a 488 nm y la emisión fue grabada simultáneamente en los canales verde (GFP) y rojo (RFP). Se muestra el empalme de ambos canales. Durante estos experimentos, la mRFP no fue directamente excitada.

De manera adicional, decidimos comprobar la reproducibilidad del efecto de dominante negativa de ERK en otros linajes celulares. Para lo anterior generamos dos líneas de células B103 (neuroblastoma de rata) que expresan de forma estable el receptor ΔN o $\Delta N\Delta C$ (Ver Material y Métodos). También utilizamos células embrionarias de riñón humano (HEK293) que expresan transitoriamente las mutantes mencionadas. Como esperábamos, en las células B103 que expresan el receptor ΔN observamos un incremento en la fosforilación de ERK en respuesta a NA y a EGF respecto al basal (Fig. 13A). Sin embargo, el incremento fue estadísticamente menor en las células B103 que expresan el receptor truncado en la región carboxilo ($\Delta N\Delta C$). En contraste, observamos un aumento en la activación de ERK en respuesta a NA y LPA, tanto en las células HEK 293 ΔN como en las $\Delta N\Delta C$ (Fig. 13B). Es decir, el efecto de dominante negativa de ERK ocurrió en las células Rat-1 y B103 $\Delta N\Delta C$ (Fig. 13A), pero no en las HEK293 (Fig. 13B). Por lo tanto, el efecto de la mutación en la región carboxilo del receptor sobre la vía de ERK es dependiente del tipo celular.

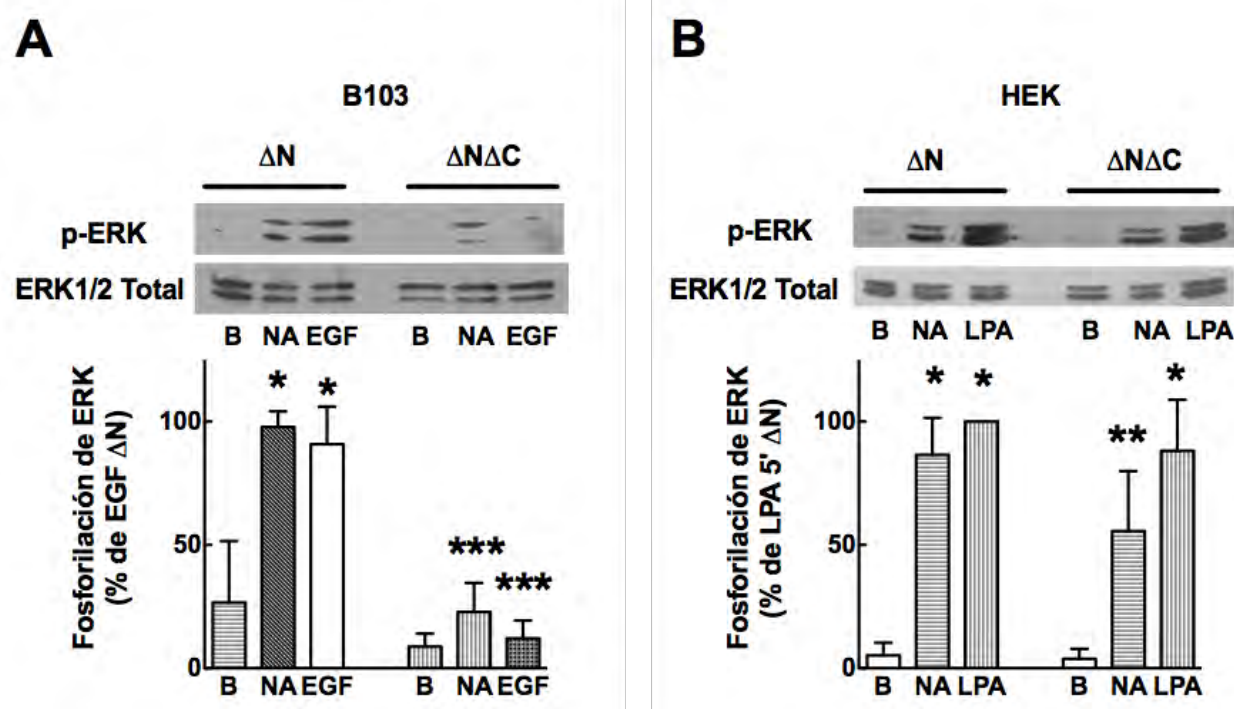


Figura 13. La actividad de dominante negativa de ERK del α_{1D} -AR $\Delta N\Delta C$ es dependiente del tipo celular. Las células B103 (**A**) y HEK293 (**B**) que expresan el α_{1D} -AR ΔN o $\Delta N\Delta C$ fueron incubadas por 5 min en ausencia (B, basal) o presencia de noradrenalina (NA) 10 μ M más propanolol 1 μ M, ácido lisofosfatídico (LPA) 1 μ M o factor de crecimiento epidérmico (EGF) 100 ng/mL. La fosforilación de ERK1/2 se detectó mediante Western blot. La respuesta fue normalizada respecto al máximo observado, EGF en (**A**) y LPA en (**B**), considerado como 100%. En ambos paneles, se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.005$ vs a su respectivo basal; ** $p < 0.001$ vs a su respectivo basal; *** $p < 0.005$ vs el mismo tratamiento en células que expresan el receptor ΔN .

6.3 La activación de ERK es dependiente de PKC.

El siguiente objetivo fue caracterizar el mecanismo molecular del receptor $\Delta N\Delta C$ para ejercer su efecto dominante negativo sobre ERK. Buscamos identificar el elemento de la vía de señalización a partir del cual se bloqueara la señal del receptor $\Delta N\Delta C$ cuando lo sometimos a distintos estímulos. Nuestro primera candidata fue PKC por las siguientes razones: 1) Ambas mutantes (ΔN y $\Delta N\Delta C$) responden a la estimulación con su agonista e incrementan los niveles de calcio intracelular y son desensibilizados por PKC (Rodríguez-Pérez, et al., 2009a) (Fig. 6) 2) Se ha reportado que PKC puede fosforilar directamente a Raf-1 (la MAP cinasa cinasa cinasa de ERK1/2), tanto *in vitro* como *in vivo* en fibroblastos NIH 3T3 (Kolch et al., 1993). Por lo que probamos si PKC estaba involucrada en la activación de ERK en nuestro modelo. Para esto, incubamos las células Rat-1 que expresan la mutante ΔN en presencia o ausencia del inhibidor general de PKC: bisindolilmaleimida (BIM). Después evaluamos la fosforilación de ERK en respuesta a la estimulación con NA durante 1, 5 y 30 min. Observamos un marcado incremento en los niveles de p-ERK en las células estimuladas con NA en ausencia del inhibidor (control positivo), pero no encontramos señal en las células tratadas con el inhibidor (Fig. 14A). El inhibidor solo no alteró los niveles basales ni la fosforilación de ERK mediada por EGF (Fig. 14B). Estos datos indicaron que la activación de ERK mediada por el receptor ΔN , pero no por el receptor de EGF, es dependiente de PKC.

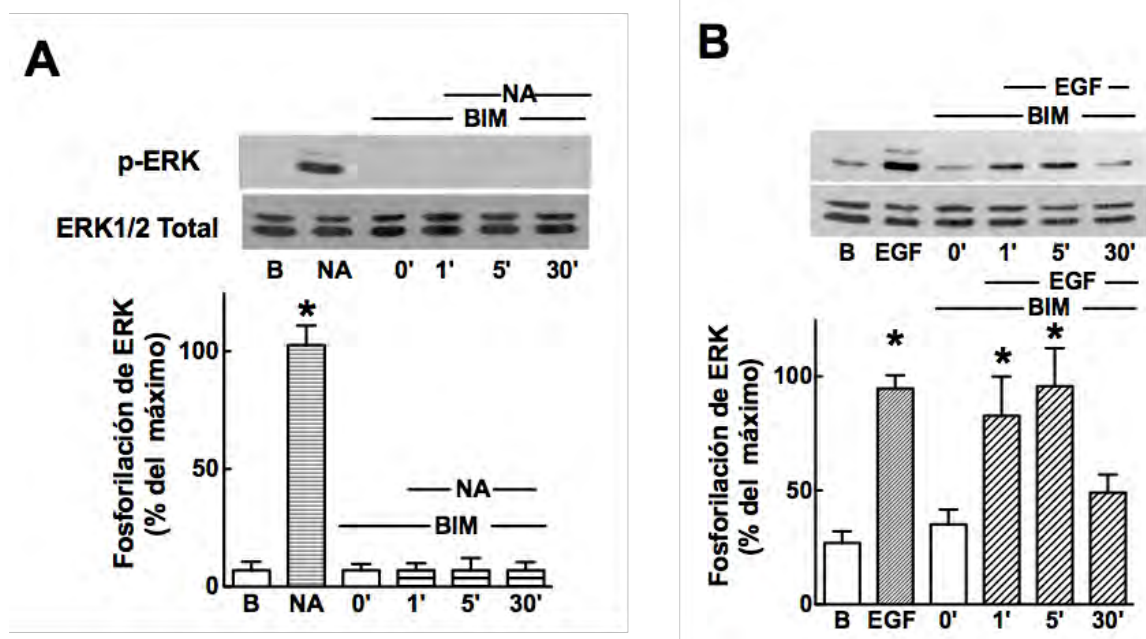


Figura 14. La activación de ERK en células Rat-1 que expresan el receptor α_{1D} -AR ΔN es dependiente de PKC. Las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN fueron preincubadas por 30 min con bisindolilmaleimida (BIM) 10 μM y luego retadas por los tiempos indicados con noradrenalina (NA) 10 μM (A) o con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) 100 ng/mL (B). Las fosforilación de

ERK1/2 fue determinada por Western blot. Se incluyeron controles internos preincubados por 30 min con el vehículo e incubados por 5 min en la ausencia (*B*, basal) o presencia de noradrenalina (NA) 10 μ M (A) o EGF 100 ng/mL (B). La respuestas se normalizaron respecto al máximo observado, NA en (A) y EGF en (B) considerado como 100%. Se muestran blots representativos de fosfo ERK1/2 y ERK1/2 totales. En ambos paneles, se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.005$ vs a su respectivo basal.

6.4 La vía de ERK está interrumpida entre PKC y Raf-1 en células que expresan el receptor $\Delta N\Delta C$.

Para obtener evidencia adicional del papel de PKC en la activación de ERK, activamos farmacológicamente a esta cinasa usando forbol miristato acetato (PMA) en las células ΔN y $\Delta N\Delta C$. La fosforilación de ERK aumentó marcadamente en las células que expresan el receptor ΔN estimuladas con el éster de forbol, pero no en las células que expresan la mutante truncada en el carboxilo ($\Delta N\Delta C$) (Fig. 15). Es decir, en estas células la activación directa de PKC no fue capaz de activar la señalización de ERK, pero sí de inducir la fosforilación (Rodríguez-Pérez, et al., 2009a) y la desensibilización del α_{1D} -AR. Estos resultados indicaron que la vía de ERK está inhibida río abajo de PKC en las células $\Delta N\Delta C$.

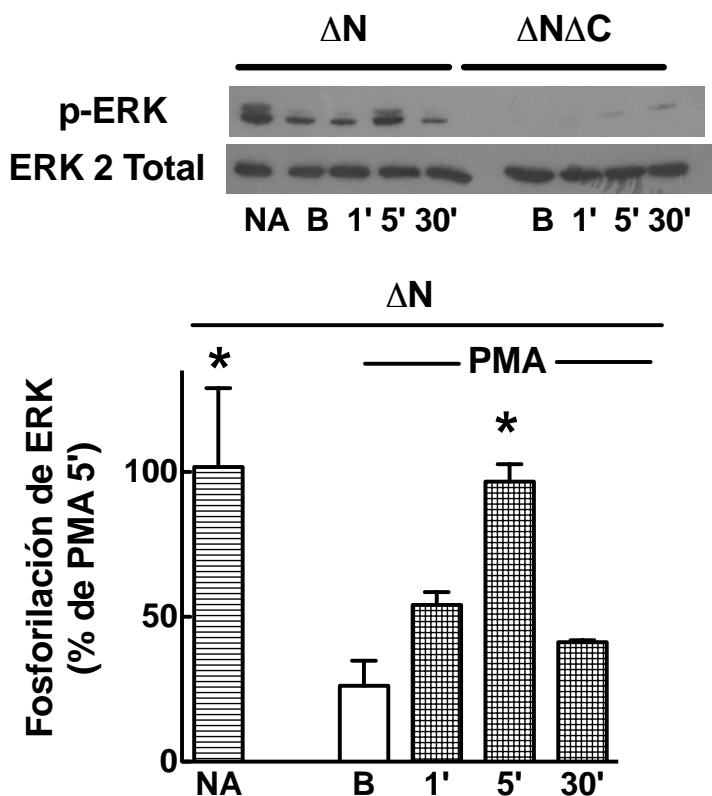


Figura 15. Efecto de la activación farmacológica de PKC en la fosforilación de ERK. Las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN o $\Delta N\Delta C$ fueron estimuladas con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M por 1, 5 y 30 min. La estimulación con noradrenalina (NA) 10 μ M se utilizó como control positivo. Se evaluó la fosforilación de ERK1/2 mediante Western blot y la respuesta de las células que expresan el receptor ΔN se normalizaron respecto al máximo observado (PMA, 5 min) considerado como 100%. *B* indica niveles basales. No se presentan datos cuantitativos de la respuesta en las células $\Delta N\Delta C$ porque fue muy pequeña y en la mayoría de los casos ausente. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. Se muestran blots representativos de p-ERK1/2 y ERK2 total. * $p < 0.005$ vs su respectivo basal.

La siguiente estrategia que seguimos para explicar el mecanismo de dominante negativa del receptor $\Delta N\Delta C$ sobre la vía de ERK, fue analizar el estado de fosforilación de los elementos río abajo de PKC en la cascada: Raf-1 y MEK1 (Fig. 2). Observamos que el tratamiento con PMA causó un dramático incremento en la fosforilación de Raf-1 y MEK1 en las células ΔN , pero no en las $\Delta N\Delta C$ (Fig. 16). Esto significa que en las células que expresan la mutante truncada de la región carboxilo, el PMA no activa la vía de ERK a partir de Raf-1, a pesar de que PKC es funcional. En otras palabras la vía está inhibida entre PKC y Raf-1.

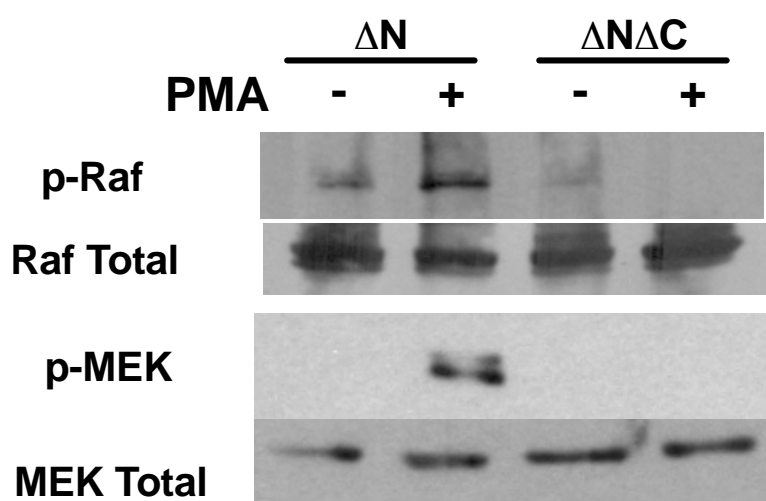


Figura 16. Efecto de la activación farmacológica de PKC en la fosforilación de Raf-1 y MEK1.

Las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN o $\Delta N\Delta C$ fueron estimuladas con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M por 5 min. Se evaluó la fosforilación de Raf-1 y MEK1 mediante Western blot. Se muestran blots representativos que muestran las formas totales y fosforiladas de Raf-1 y MEK1. Estos experimentos se repitieron 4 veces para cada cinasa y se obtuvieron los mismos resultados.

6.5 La expresión del α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo activa la vía de p38.

Posteriormente exploramos la señalización de otras MAP cinasas mediada por las mutantes ΔN y $\Delta N\Delta C$. Evaluamos la activación de la vía de p38. En las células que expresan el receptor ΔN , la fosforilación basal presentó cierta variabilidad pero claramente incrementó en respuesta a noradrenalina o PMA (Fig. 17). En contraste, en las células que expresan al receptor $\Delta N\Delta C$, p38 se encontró fosforilado desde el estado basal. No detectamos un incremento adicional en la activación de p38 luego de la estimulación con noradrenalina o PMA (Fig. 17). En otras palabras, la expresión del α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo activa la vía de p38, sin que se requiera estímulo adicional alguno.

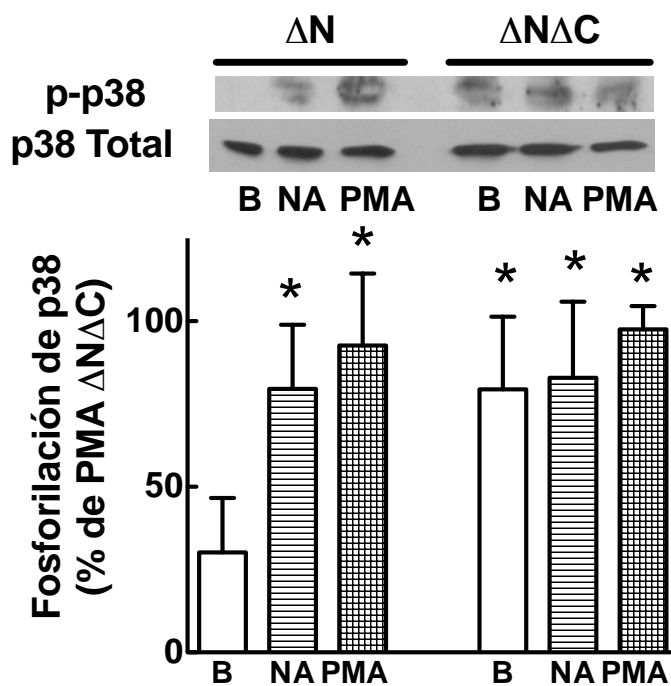


Figura 17. Efecto de la noradrenalina y el forbol miristato acetato en la fosforilación de p38. Las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN o $\Delta N\Delta C$ fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μ M o con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M por 5 min. Se evaluó la fosforilación de p38 mediante Western blot y las respuestas se normalizaron respecto al máximo observado (PMA, 5 min en las células $\Delta N\Delta C$), considerado como 100%. *B* indica niveles basales. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. Se muestran blots representativos de p-p38 y p38 total. * $p < 0.005$ vs basal de ΔN .

6.6 La expresión del α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo no afecta la viabilidad celular.

Debido a que hemos encontrado diferencias en la activación de la vía de las MAP cinasas entre las células ΔN y $\Delta N\Delta C$, analizamos la repercusión de la mutación de la región carboxilo en la viabilidad celular. Para esto, realizamos ensayos de reducción de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Este es un método útil para evaluar la actividad metabólica de las células, ya que la oxidoreductasa dependiente de NAD(P)H puede reflejar el número de células viables. Estas enzimas reducen la sal de MTT a su forma insoluble (formazán) que tiene un color morado. Medimos la absorbancia del colorante reducido luego de 1, 2, 3 y 4 días de incubar las células con medio suplementado con suero fetal bovino. Sin embargo, no se observa diferencia significativa en la viabilidad entre ambas líneas celulares a ninguno de los tiempos analizados (Fig.18). Es decir, pese a modificar la activación de vías de señalización involucradas con proliferación (MAP cinasas), la mutación de la región carboxilo no repercutió en la viabilidad celular.

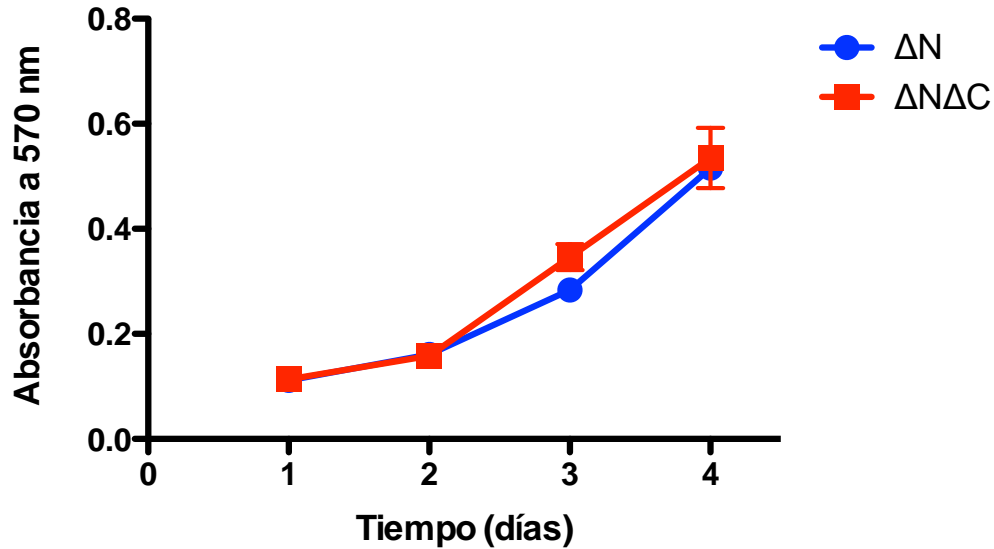


Figura 18. Las mutaciones del α_{1D} -AR no repercuten en la viabilidad celular. Las células Rat-1 que expresan el α_{1D} -AR ΔN o $\Delta N\Delta C$ fueron incubadas en medio suplementado con suero fetal bovino durante 1, 2, 3 y 4 días y la reducción de la sal de MTT se determinó al medir la absorbancia a 570 nm de la sal reducida. Se realizaron dos ensayos por triplicado.

En resumen, los receptores α_{1D} -AR truncados en su región carboxilo tienen propiedades de señalización distintas a los receptores que contienen dicho dominio. Su principal característica es pueden activar la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} , pero no la vía de ERK. Además pueden bloquear la señalización de ERK mediada por otros GPCRs, por receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs) y por la activación farmacológica de PKC. En otras palabras, los α_{1D} -AR $\Delta N\Delta C$ ejercen un efecto de dominante negativa sobre la vía de ERK. Por lo tanto concluimos que la región carboxilo participa en la regulación de las cascadas de señalización mediadas por la activación del α_{1D} -AR.

7. RESULTADOS

Parte II: Identificación y caracterización funcional de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga.

7.1 Análisis *in silico* del α_{1D} -AR.

En nuestro grupo se ha descrito que el receptor α_{1D} adrenérgico es una fosfoproteína cuyo estado de fosforilación está asociado tanto a desensibilización mediada por noradrenalina (homóloga) como por factores no relacionadas (heteróloga). Sin embargo, a la fecha se desconocen los sitios exactos de fosforilación de este receptor. Para obtener información sobre los posibles residuos fosforilables, se introdujo la secuencia primaria del ortólogo de humano (Uniprot, P25100) en los programas Netphos 3.1 y GPS 3.0. De los resultados arrojados, se consideraron únicamente las predicciones con valor > 0.75 para Netphos y >10 para GPS. Ambos programas encontraron sitios probables de fosforilación tanto en la tercera asa intracelular del receptor (IL3), como en su región carboxilo (COOH) (Fig. 19). En los dos casos se detectaron residuos de serina y treonina, pero sólo Netphos 3.1 predijo un residuo de tirosina en la IL3. Para obtener una secuencia consenso, se compararon ambos resultados y se consideraron únicamente a los residuos predichos por las dos herramientas bioinformáticas. Dichos aminoácidos se indican en letras negritas en la figura 19.

#	278	283	284	285	287	300	313	323	328	331	332	334	341
Sec	Y	S	T	T	S	S	T	S	T	S	S	S	S
Netphos	Y	S	T		S			S	T		S	S	S
GPS		S	T	T	S	S		S	T		S	S	S

#	406	434	441	442	443	452	453	465	477	486	492	507	508
Sec	S	Y	S	T	S	S	S	T	T	S	S	T	T
Netphos	S		S	T		S			T		S	T	T
GPS	S		S	T				T	T		S	T	T

#	515	516	518	537	543	555	559	564	565	570
Sec	S	S	S	S	S	T	Y	Y	S	T
Netphos	S		S	S						
GPS	S	S		S				S	T	

IL3

COOH

Figura 19. Predicción de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR. Se muestran los sitios probables sitios de fosforilación del α_{1D} -AR. Se obtuvieron al introducir la secuencia primaria del ortólogo de humano (Uniprot, P25100) en los programas Netphos 3.1 y GPS 3.0. Se indican todos las serinas, treoninas y tirosinas (sec), el número de residuo, su localización en la tercera asa intracelular (IL3) o región carboxilo (COOH), los sitios arrojados por Netphos y por GPS. La secuencia consenso se obtuvo al considerar sólo los residuos predichos por ambos programas (en negritas).

El programa GPS, predice los sitios probables de fosforilación de una proteína basado en secuencias consenso reportadas experimentalmente, pero también estima las cinasas que llevarían a cabo esta modificación post-traducciona (Xue et al., 2008). Por lo que utilizamos esta herramienta para complementar la información previa y predecir las cinasas que fosforilan al receptor α_{1D} . En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos indicando el residuo, su localización, así como las probables cinasas involucradas. Se encontró la presencia de cinasas relacionadas a vías de señalización como AKT y PDK1, también identificamos distintas isoformas de las cinasas de GPCRs (GRKs), así como de la proteína cinasa C.

Tabla 4. Predicción de las cinasas que fosforilan al α_{1D} -AR.

Cinasa	#	a. a.	Secuencia	Localización
PKCa, GRK6, GRK7, PKA, p38	300	S	KRER G KASEVVLRIH	IL3
PKCa, PKCd, GRK2, GRK5, p38	323	S	DGAHGMR S AKGHTFR	IL3
PKCa, PKCd, PKCi, AKT1, PDK1	328	T	MRS A KGHTFRSSLSV	IL3
Sin predicción	331	S	KGHTFR S SLSVRLK	IL3
PKCa, PKCd, GRK4, GRK6, PKA	332	S	KGHTFR S SLSVRLK	IL3
PKCa, PKCch, GRK4, p38 (SAPK4)	334	S	HTFR S SLSVRLKFS	COOH
AKT	442	T	GHHWR A STGLRQDC	COOH
GRK, PDK1, ERK, JNK, Nmo, p38	477	T	PDPEPP G TPEMQAPV	COOH
GRK5	486	S	EMQAPVA S RRKPPSA	COOH
PKCa, PKCd, PKA, AKT1, ERK1, p38	492	S	ASRRKPP S AFREWRL	COOH
PKCd, PKCd, GRK2, PKA	507	T	LGPFR R PTTQLRAKV	COOH
PKCb	515	S	TQLRAKV S SLSHKIR	COOH
PKCa, PKCd, PKCz, GRK2, PKA, AKT1	516	S	QLRAKV S SLSHKIRA	COOH
PKCa, PKCe, GRK2	518	S	RAKV S SLSHKIRAGG	COOH
GRK2, GRK6	543	S	RSEVEAV S LGVPHEV	COOH

Estas dos últimas familias de cinasas juegan un papel central en el proceso de desensibilización homóloga y heteróloga, tema central de esta tesis. Por tal motivo, clasificamos los sitios obtenidos de acuerdo a su relación sitio/cinasa utilizando el siguiente código de color: GRK, verde; PKC, rojo; ambas cinasas, amarillo. Los resultados se muestran en la figura 20. Se observa que existen sitios probables de

fosforilación exclusivos de GRK, otros para PKC y algunos más que podrían ser blanco de ambas cinasas. En la representación en dos dimensiones del receptor se muestra que los residuos predichos, se localizan espacialmente tanto en la tercera asa intracelular como en la región carboxilo (Fig. 20).

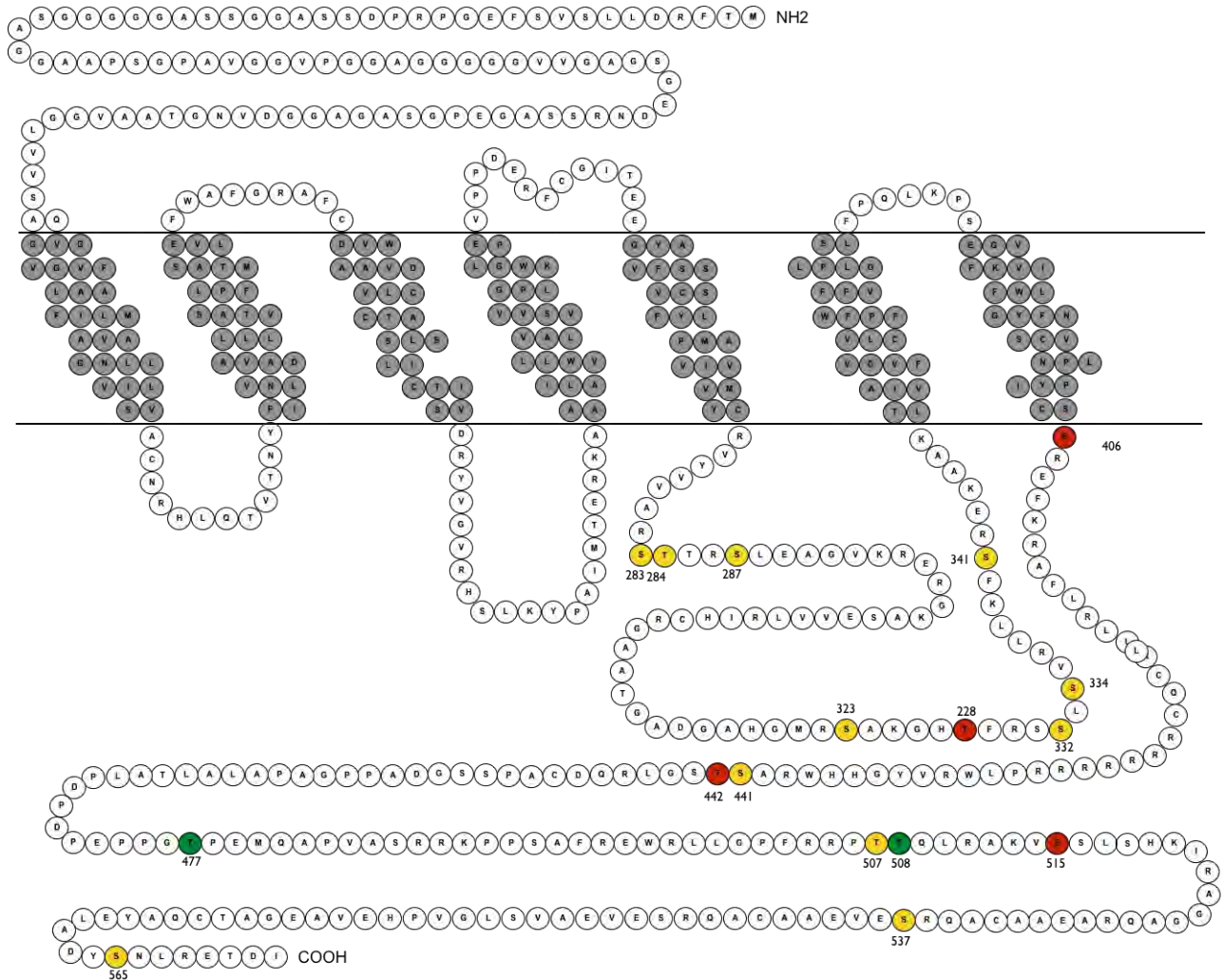


Figura 20. Representación de los sitios probables de fosforilación del α_{1D} -AR. Se muestran un esquema en 2D del α_{1D} -AR. En colores se indican los probables sitios de fosforilación consenso. En verde los sitios probables de fosforilación por GRK, en rojo los sitios probables de fosforilación por PKC, en amarillo por ambas cinasas. Se indica el número de residuo.

Se sabe poco sobre la participación de los dominios arriba mencionados en la regulación del receptor α_{1D} y su estructura cristalográfica aún no ha sido determinada. Por lo que nos dimos a la tarea de obtener una predicción de la estructura tridimensional del receptor. Para lo anterior, se introdujo la secuencia de la proteína en el programa Swiss-model. Inicialmente, dicho programa arrojó el modelo que se muestra en la figura 21A. Se observa que dicho modelo contiene los siete dominios transmembranales característicos de los GPCRs. En verde se aprecia región transmembranal 1 (TM1) y en

azul celeste (cian) la 7 (TM7). Sin embargo, el programa no predijo la estructura de las regiones amino extracelular y carboxilo terminal. Se observa también la presencia de alfa hélices que se encuentran fuera del espacio correspondiente a la membrana. Llama la atención, que una de estas hélices está en la tercera asa intracelular del receptor (marcada con rojo) (Fig. 21A). Estas predicciones cobraron relevancia puesto que se sabe que la tercera asa intracelular puede participar en la regulación de GPCRs.

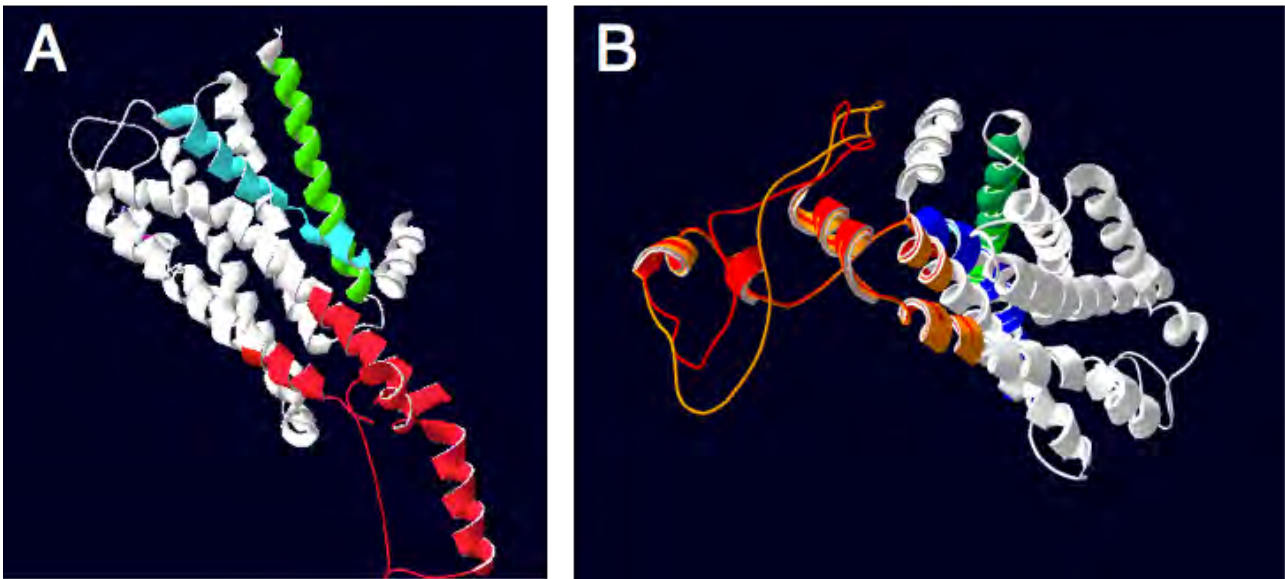


Figura 21. Modelado de la estructura tridimensional del α_{1D} -AR. (A) Modelo de la estructura del receptor α_{1D} -AR. En verde el segmento transmembranal 1 (TM1); en cian el 7 (TM7); en rojo la tercera asa intracelular. **(B)** Empalme del modelo del receptor silvestre (Wt) y del receptor con sustituciones de las serinas 283, 287, 323, 332, 334, 341 por aspartato (S/D) (tercera asa intracelular en naranja). Ambos modelos se obtuvieron al introducir la secuencia primaria del ortólogo de humano en el programa Swiss Model.

Algunas de las serinas y treoninas potencialmente fosforilables del receptor se localizan en la IL3 y se sabe que la fosforilación puede generar cambios de conformación al adicionar una región con carga negativa a la proteína. Por lo anterior, generamos un nuevo modelo del receptor silvestre (Wt) y otro con sustituciones de las serinas 283, 287, 323, 332, 334, 341 por aspartato (S/D) para mimetizar fosforilación constitutiva. En la figura 21B se muestra el empalme de ambos modelos. En rojo se observa la tercera asa del receptor silvestre; en naranja de la mutante S/D. Se aprecia un discreto desplazamiento en la disposición de la tercera asa al sustituir los residuos de serina, mientras que el resto de la estructura permanece idéntica en ambos modelos.

7.2 Purificación del α_{1D} -AR para espectrometría de masas.

Los datos obtenidos previamente mediante análisis *in silico* nos proporcionaron un buen acercamiento sobre los dominios involucradas en la regulación del receptor y sus sitios potenciales de fosforilación. Con base a nuestra predicción bioinformática, decidimos comprobar experimentalmente estos resultados. Para lograrlo empleamos la tecnología de espectrometría de masas, ya que por su alta sensibilidad permite obtener la secuencia del receptor y sus sitios de fosforilación simultánea e inequívocamente.

Para obtener una muestra apropiada para análisis de espectrometría de masas, el primer requisito es purificar una cantidad de proteína detectable en geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie (100 ng de proteína). Por lo que decidimos utilizar un sistema de sobre-expresión de proteínas inducible que funcionara en células de mamífero. El sistema Flp-In T-rex permite la expresión controlada de proteínas al agregar un inductor al medio y ha sido empleado para estudios de GPCRs *in celulo* en nuestro grupo (Sánchez-Reyes, et al., 2014; Sosa-Alvarado et al., 2015) y también por otros laboratorios (Ward et al., 2011). Por lo anterior, subclonamos al receptor α_{1D} en dicho sistema (Ver Material y Métodos). La construcción resultante tiene las siguientes características: el receptor α_{1D} truncado en la región amino para favorecer su expresión en membrana ($\Delta 1-79$) (Hague et al., 2004a) y una fusión en la región carboxilo con la proteína verde fluorescente (GFP) para monitorear la expresión del receptor y purificarlo (Fig. 22A). Posteriormente, transfectamos las células parentales HEK293 del sistema T-rex con el plásmido antes descrito para generar una línea estable e inducible (Ver Material y Métodos). Se comprobó la expresión de la proteína al incubar las células con el inductor (doxiciclina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 18 h para luego observar al reportero en un microscopio de epifluorescencia (Fig. 22B). Posteriormente corroboramos la funcionalidad del receptor al evaluar la liberación de Ca^{2+} intracelular. Agregamos propanolol a las células para inhibir sus receptores β -adrenérgicos endógenos y observar únicamente la respuesta α_1 -adrenérgica. Al estimular las células con noradrenalina, observamos un incremento en los niveles de calcio en respuesta a noradrenalina (Fig. 22C). Dicha concentración de calcio regresa a niveles cercanos al basal poco después de alcanzar su pico máximo. Adicionalmente, evaluamos la fosforilación del receptor en respuesta a su ligando (NA) y a la activación farmacológica de PKC mediante el éster de forbol PMA. En el carril 1 de la figura 22D se aprecia una banda que corresponde al peso molecular esperado para el receptor fusionado con la GFP (110 kDa), lo que indica que el receptor se fosforila en su estado basal. Esta

fosforilación incrementa luego de la estimulación con NA y PMA (carril 2 y 3). La técnica de análisis de fosforilación empleada en nuestro laboratorio tiene como principio el marcaje metabólico con fósforo radioactivo y la inmunoprecipitación de la proteína de interés. De esta manera se comprobó no solo que el receptor es fosforilado, sino que además puede ser inmunoprecipitado eficientemente.

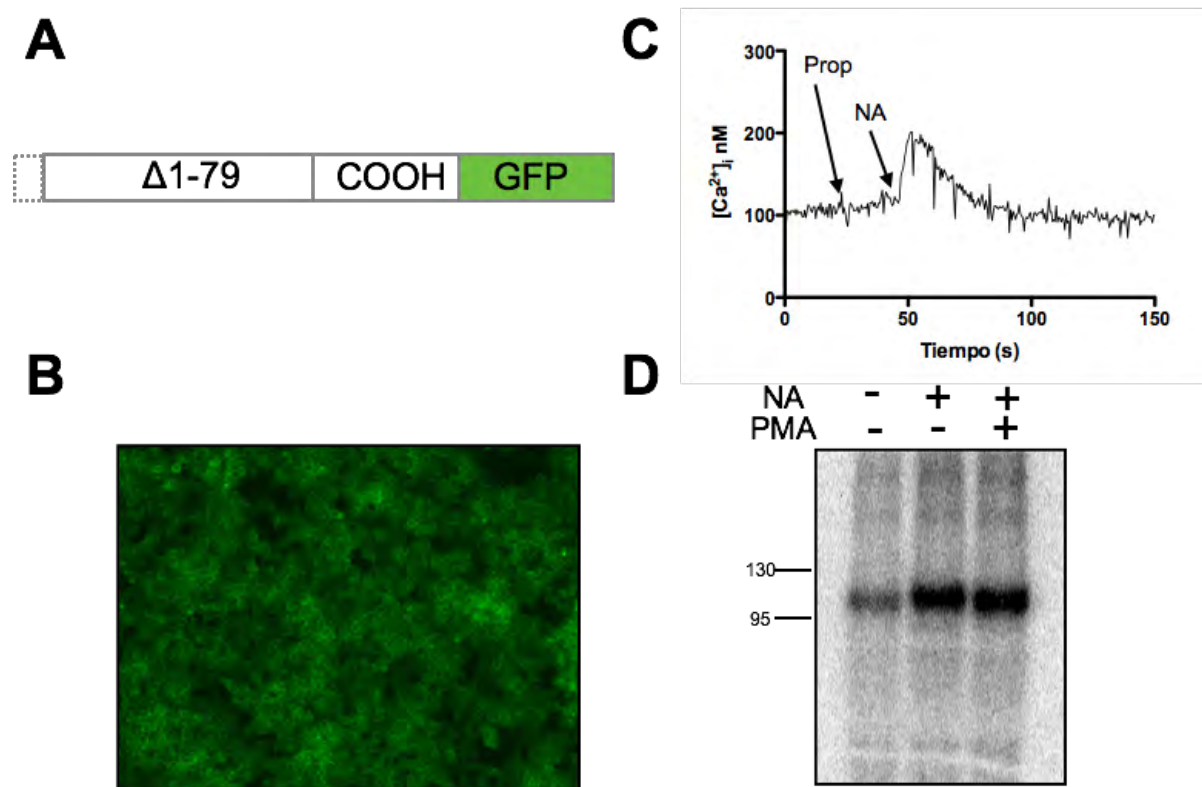


Figura 22. Generación de una línea celular que expresa el α_{1D} -AR-GFP de forma inducible. (A) Representación de la construcción del α_{1D} -AR truncado en la región amino ($\Delta 1-79$) y fusionado en su cola carboxilo a la proteína verde fluorescente (GFP). **(B)** Imagen de epifluorescencia de las células HEK293 del sistema inducible T-rex incubadas toda la noche con doxiciclina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se observa la expresión del α_{1D} -AR Δ N-GFP en verde. **(C)** Trazo representativo de la determinación de calcio intracelular usando las células HEK293 que expresan el α_{1D} -AR Δ N-GFP. Las células fueron pretratadas con propanolol 1 μM y luego estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μM (flechas). **(D)** Imagen representativa de la determinación de la fosforilación del α_{1D} -AR Δ N-GFP mediante marcaje radiactivo. Las células se estimularon con noradrenalina (NA) 10 μM o forbol miristato acetato (PMA) 1 μM durante 15 min.

Decidimos tomar ventaja de este último punto para purificar una cantidad suficiente de receptor para el análisis por espectrometría de masas. Estandarizamos un protocolo de inmunoprecipitación a gran escala que permitió observar una banda con el peso molecular esperado para el receptor α_{1D} -GFP (Ver Material y Métodos). En el panel izquierdo de la Figura 23A presentamos un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie. En el primer carril se muestran las proteínas provenientes de células T-rex en

ausencia de doxiciclina, es decir, que no expresan al receptor y que funcionan como control negativo del experimento. En el segundo se observa la aparición de una banda con el peso molecular esperado para el receptor α_{1D} -GFP. En ambos carriles se aprecian dos pares de bandas robustas que corresponden a las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo con el que se llevó a cabo la purificación. Para corroborar la identidad de la proteína purificada, se corrió un gel en paralelo con 1/25 de la muestra y mediante análisis de Western blot se evaluó la presencia de la GFP. En el panel derecho de la figura 23A se observa la presencia de una banda que corresponde al peso molecular de la proteína purificada a gran escala.

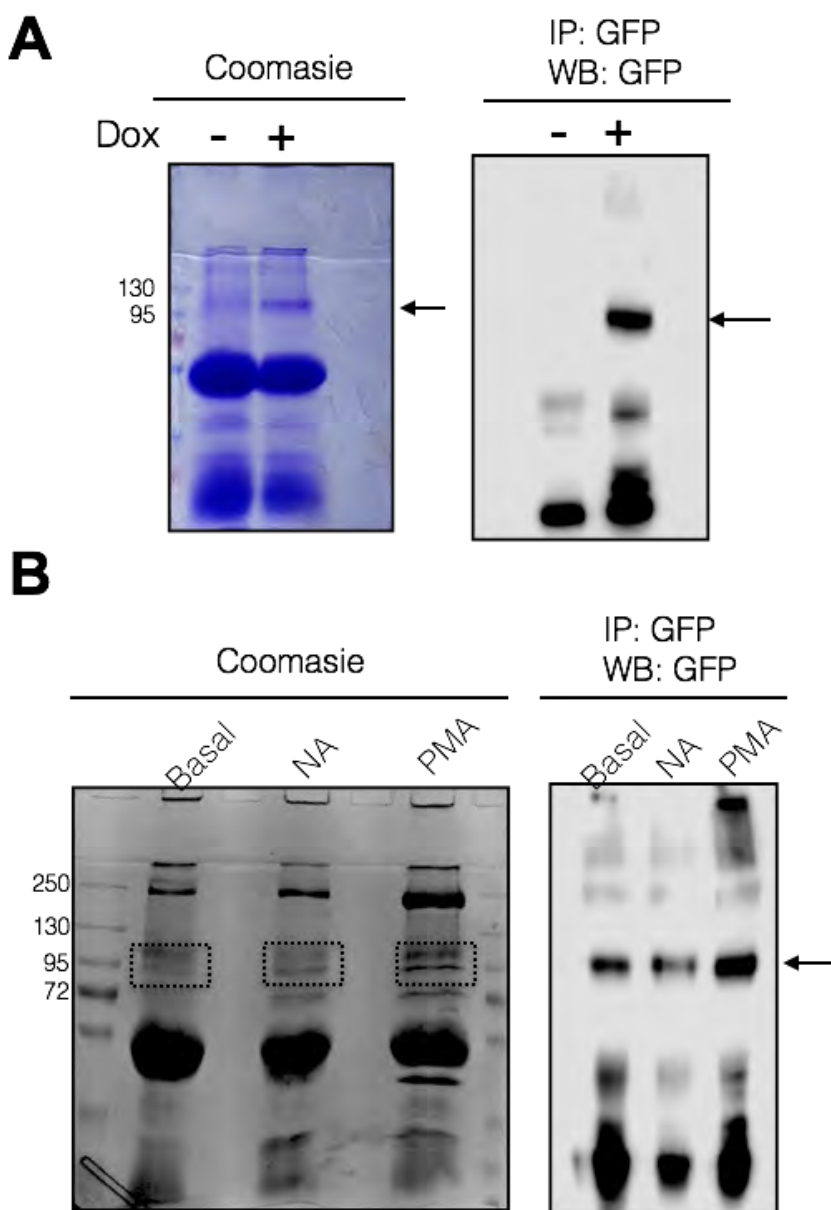


Figura 23. Purificación del α_{1D} -AR para su análisis por espectrometría de masas. (A)

Panel izquierdo: las células HEK293 del sistema T-rex fueron incubadas en presencia o ausencia de doxiciclina 1 μ g/mL toda la noche. Se muestran los extractos purificados mediante inmunoprecipitación a gran escala (IP) y corridos en un gel teñido con azul de Coomasie. Se indica con una flecha la banda que corresponde al peso molecular del receptor purificado. **(A)**

Panel derecho: se muestra un Western blot anti GFP de las mismas muestras purificadas para comprobar la identidad de la banda. **(B)** Panel izquierdo: las células HEK293 del sistema T-rex fueron incubadas con doxiciclina 1 μ g/mL toda la noche y posteriormente estimuladas con vehículo (Basal), noradrenalina (NA) 10 μ M o forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M durante 15 min. Posteriormente se purificaron como en (A); se muestra un gel teñido con Coomasie. En

cuadros punteados se indican las bandas que corresponden al receptor y que fueron enviadas a espectrometría de masas. **(B)** Panel derecho: Western blot anti GFP como en A panel derecho.

Una vez que comprobamos la eficiencia de nuestro método, realizamos la inmunoprecipitación a gran escala de proteínas (Ver Materiales y Métodos) provenientes de células inducidas con doxiciclina en las siguientes condiciones: no estimuladas (basal), estimuladas con noradrenalina o con PMA durante 15 min. Lo anterior, para evaluar los sitios que se fosforilan durante la desensibilización homóloga y heteróloga del receptor y compararlos con el estado basal. En el panel izquierdo de la figura 23B se muestra un gel teñido con azul de Coomasie donde se indican con una flecha las proteínas purificadas en las condiciones antes descritas. De igual manera se corroboró la identidad de las bandas mediante un ensayo de Western blot que muestra la presencia de la GFP en las tres condiciones (Figura 23B, panel derecho). En ambos geles, el peso molecular de la proteína purificada corresponde al esperado (110 kDa).

7.3 El análisis de espectrometría de masas reveló un código de fosforilación del α_{1D} -AR y nuevas proteínas asociadas.

Una vez purificado el receptor α_{1D} -GFP en las tres condiciones: ausencia de estímulo o incubados con NA y PMA, se cortaron las regiones marcadas en cuadros punteados (Fig. 23B, panel izquierdo). Las muestras se enviaron a la Unidad de Espectrometría de Masas de la Universidad de Harvard (<https://taplin.med.harvard.edu>) a cargo del Dr. Ross Tomaino. Los experimentos se realizaron por triplicado para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Para la asignación de sitios de fosforilación en los péptidos obtenidos se tomó en cuenta lo siguiente: a) si ambos valores A score 1a y 1b fueron >19 se consideró como sitio de fosforilación confiable; b) si se detectaron dos o más sitios de fosforilación en el mismo péptido, el A score 1 corresponde al localizado hacia la región N-terminal, mientras que el A score 2 corresponde al péptido que va hacia el C-terminal; c) Péptidos con A score >1000 se consideraron como sitios inequívocos.

Se llevó a cabo el análisis de los datos tomando en cuenta las consideraciones anteriores y se asignaron los sitios de fosforilación del receptor en las tres condiciones estudiadas (Tabla 5). Los resultados por una lado comprueban que el receptor está fosforilado en su estado basal, por otro que, dichos sitios se localizan en la tercera asa intracelular y en la región carboxilo, como lo predijeron los análisis *in silico*. También encontramos que los sitios de fosforilación de la tercera asa en el estado basal, no cambian luego de la estimulación con NA y PMA. Sin embargo, identificamos residuos fosforilables en la región carboxilo del receptor que cambiaron de acuerdo a los estímulos utilizados (Tabla 6).

Tabla 5. Representación del código de fosforilación del α_{1D} -AR.

#	a.a.	Secuencia	Localización	Basal			NA			PMA		
				PKC	GRK	PKC GRK	PKC	GRK	PKC GRK	PKC	GRK	PKC GRK
300	S	KRER GKASEVVLRIH	IL3	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
323	S	DGAHGMRSAKGHTFR	IL3	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
328	T	MRSAKGHTFRSSLSV	IL3	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
331	S	KGHTFRSSLSVRLK	IL3	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
332	S	KGHTFRSSLSVRLK	IL3	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
334	S	HTFRSSLSVRLKFS	IL3	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
442	T	GHHWRASTSGLRQDC	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
477	T	PDPEPPGTPEMQAPV	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
486	S	EMQAPVASRRKPPSA	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
492	S	ASRRKPPSAFREWRL	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
507	T	LGPFRPTTQLRAKV	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
515	S	TQLRAKVSSLSHKIR	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
516	S	QLRAKVSSLSHKIRA	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
518	S	RAKVSSLSHKIRAGG	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow
543	S	RSEVEAVSLGVPHEV	C-terminal	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow

Para obtener los códigos de fosforilación consideramos la información arrojada por el programa GPS respecto a la predicción de la cinasas involucradas en la modificación de cada sitio. Debido a que estamos interesados en estudiar los sitios regulados por GRK y PKC durante la desensibilización homóloga y heteróloga del receptor, asignamos el mismo código de color que en la figura 20. De acuerdo a su relación sitio/cinasa: GRK, verde; PKC, rojo; ambas cinasas, amarillo. Realizamos el mismo análisis para las tres condiciones estudiadas (Basa, NA y PMA). Como resultado obtuvimos tres arreglos imposibles de superponerse entre sí. En otras palabras, diferentes estímulos generaron distintos códigos de fosforilación en el receptor (Tabla 5).

Tabla 6. Los sitios de fosforilación en la región carboxilo del α_{1D} -AR obtenidos por espectrometría de masas.

#	442	477	486	492	507	515	516	518	543
a.a.	T	T	S	S	T	S	S	S	S
Basal		T	S		T	S	S	S	S
NA	T	T			T	S	S	S	S
PMA	T	T	S	S	T	S	S		S

El análisis de espectrometría de masas nos permitió además determinar ≈40% de la secuencia de amino ácidos del receptor. También se identificó una lista de péptidos distintos al receptor, que pueden considerarse como probables proteínas asociadas. En la tabla 7 se presenta una lista de algunas de las proteínas que se detectaron en los tres experimentos que se analizaron por MS. Ninguna de estas proteínas asociadas al receptor han sido reportada previamente.

Tabla 7. Nuevas proteínas asociadas al α_{1D} -AR reveladas por espectrometría de masas.

Proteína	Descripción
EEF2	Factor de elongación 2
XPO2	Exportina 2
XRCC5	Proteína complementaria de la reparación de rayos X 5
MTHFD1	C-1-tetrahidrofolato sintasa, citoplásmica
XPO1	Exportina 1
OPA1	Proteína parecida a dinamina de 120 kDa, mitocondrial
HSP90B1	Endoplasmina
NUP93	Proteína del complejo del poro nuclear Nup93
DDX21	Helicasa nucleolar de RNA 2
MCM7	Factor de replicación de DNA MCM7
XPO7	Exportina 7
MCM4	Factor de replicación de DNA MCM4
PFKP	Fosfofructocinasa ATP dependiente
TNPO1	Transportina 1
ATP1A1	Sunidad α 1 de la Na/K ATPasa
UBA2	Subunidad 2 de la enzima activadora de SUMO
ALDH18A1	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintasa
COPB1	Subunidad de coatómero
TELO2	Proteína homóloga de la reguladora de la longitud del telómero 2
DDX1	Helicasa de RNA dependiente de ATP
HSPA5	Proteína de 78 kDa reguladora de glucosa
DNM2	Dinamina 2

7.4 Generación de mutantes de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR.

Una vez identificados los sitios de fosforilación del receptor α_{1D} , el siguiente objetivo fue generar las mutantes de dichos sitios para determinar experimentalmente su repercusión funcional. Sin embargo, la detección de numerosos sitios tanto en la tercera asa intracelular como en el extremo carboxilo representaron un dificultad técnica. Por la anterior, las mutantes se consideraron de acuerdo al dominio intracelular al que se asignaron los sitios. Para el caso particular de la tercera asa se realizó un análisis que incluyó: 1) el alineamiento de las secuencias de ortólogos del receptor; 2) los sitios consenso de fosforilación *in silico*; 3) los sitios asignados mediante MS.

En la figura 24 se presenta el alineamiento de las secuencias correspondientes a las tercera asa intracelular (276-348) de los ortólogos del receptor en humano, rata, ratón, conejo y cerdo. En azul se muestran los residuos de serina y treonina. Se observa la mayoría de estos residuos están conservados en las cinco especies. La secuencia consenso de los sitios de fosforilación obtenida en la Fig. 19 al combinar los resultados de los análisis con los programas GPS y Netphos se indican con flechas verdes. Los resultados de MS se muestran en rojo. Los sitios que se encontraron mediante los dos métodos se marcaron con flechas amarillas.

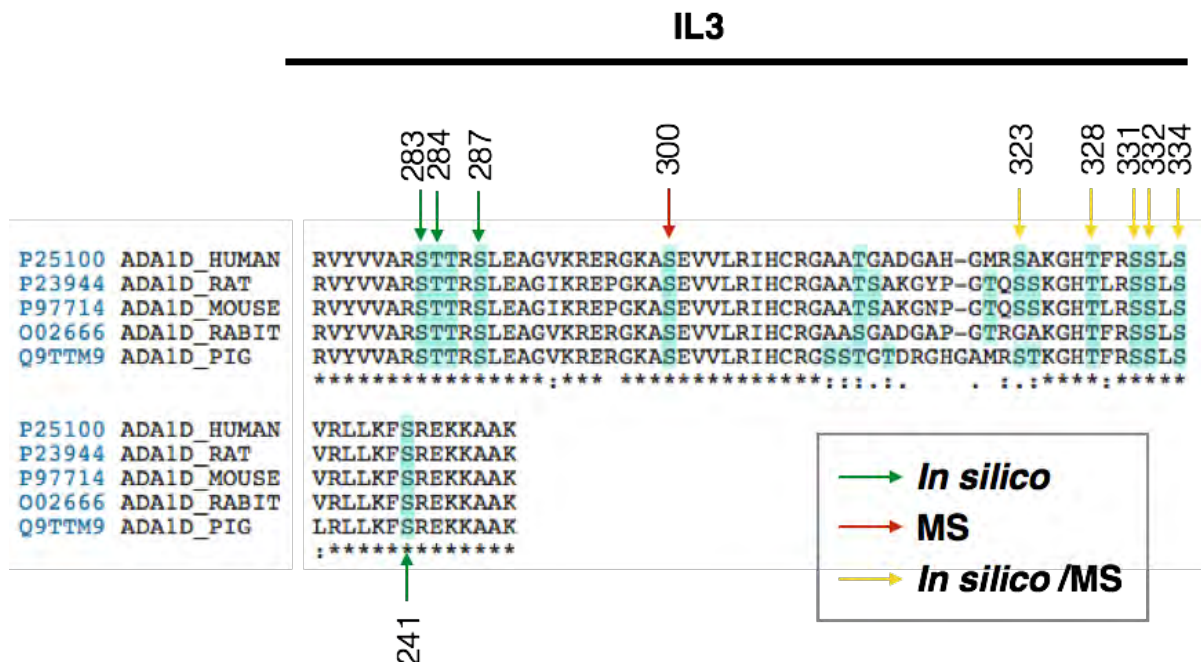


Figura 24. Comparación de los sitios de fosforilación identificados mediante análisis *in silico* y espectrometría de masas. Se muestra un alineamiento de la secuencia correspondiente a la tercera asa intracelular (IL3) del α_{1D} -AR (ortólogos de humano, rata, ratón, conejo y cerdo). Las serinas y treoninas conservadas se marcaron con azul. Se indican con flecha verde los sitios identificados únicamente mediante análisis *in silico*. Las flechas rojas indican los sitios identificados únicamente por espectrometría de masas. Con flechas amarillas los sitios identificados con ambas técnicas

Con base en el análisis anterior se consideraron los siguientes residuos de la tercera asa intracelular: S300, 323, 331, 332, 334 y T328. Mediante mutagénesis sitio dirigida se construyeron las mutantes que se esquematizan en la figura 25: 1) ΔN : receptor truncado en el amino (ésta mutante se consideró como silvestre); 2) $\Delta N\Delta C$: receptor truncado en el amino y el carboxilo; 3) ΔN -mutIL3: receptor truncado en amino y con las mutaciones S,300/323/331/332/334/AT328V en la tercera asa intracelular; 4) $\Delta N\Delta C$ -mutIL3: receptor truncado en el amino y el carboxilo con las siguientes mutaciones en la tercera asa intracelular antes mencionadas. Los residuos de serina se cambiaron por alanina y treonina por valina para evitar la fosforilación de dichos sitios. Todas las mutantes generadas fueron truncadas en la región amino para incrementar su expresión en la membrana plasmática ($\Delta 1-79$) y fusionadas con GFP en su extremo carboxilo (Ver Material y Métodos)

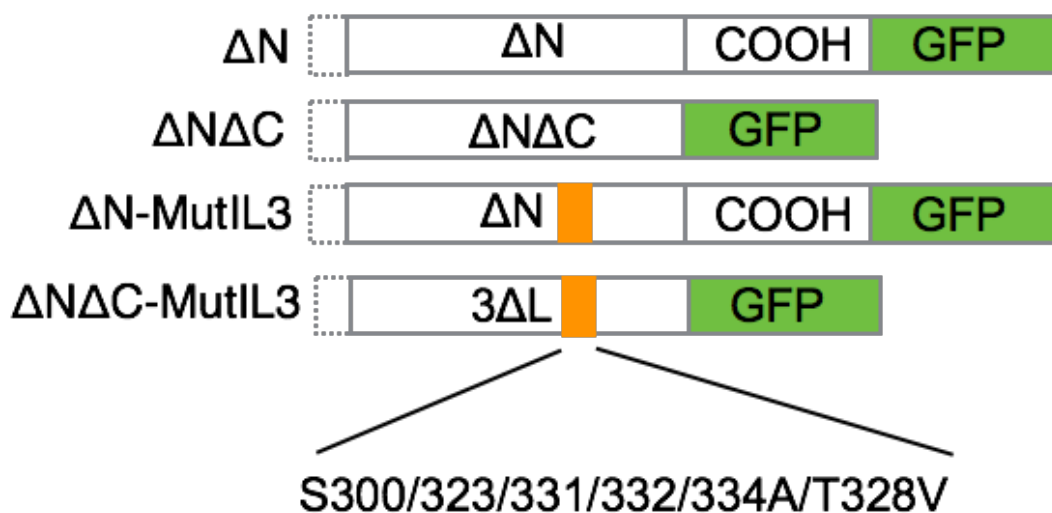


Figura 25. Mutantes de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR. Representación gráfica de las mutantes generadas para estudiar funcionalmente los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR. ΔN : truncada sólo en el amino; $\Delta N\Delta C$ truncada en la región amino y carboxilo; ΔN -mutIL3: truncada en la región amino y con las sustituciones S300/323/331/332/334A/T328V en la tercera asa intracelular; $\Delta N\Delta C$ -mutIL3: sólo las sustituciones en la tercera asa. Los aminoácidos mutados en la región amino fueron $\Delta 1-79$ y en el carboxilo $\Delta 441-572$.

7.5 Los dominios intracelulares del α_{1D} -AR tienen distintas cinéticas de fosforilación.

Luego de generar las mutantes descritas en la figura 25, comenzamos su caracterización. En la primera parte nos concentramos en describir su cinéticas de fosforilación. En la figura 26 se muestran cursos temporales de estimulación con noradrenalina. Esto para estudiar la desensibilización homóloga del receptor. Como se describió previamente, el receptor ΔN está fosforilado en su estado basal. Dicha fosforilación tiene un pico máximo luego de 2 y 5 min de incubación con el agonista y regresa a niveles cercanos al basal luego de 60 min. Por otro lado, la mutante $\Delta N\Delta C$ incrementa rápidamente su fosforilación después de 2 min en presencia del estímulo, pero permanece elevada a todos los tiempos probados. La mutante ΔN -mutL3 se comportó de manera similar. Sin embargo, no observamos fosforilación de la mutante total ($\Delta N\Delta C$ -mutL3) en ninguno de los tiempos evaluados. Por un lado, esto comprueba experimentalmente que la fosforilación del α_{1D} -AR ocurre en las regiones carboxilo y tercera asa intracelular. Por otro, que el receptor se fosforila en la tercera asa intracelular durante su desensibilización homóloga. Esto ocurre específicamente en los residuos: S300, 323, 331, 332, 334 y T328.

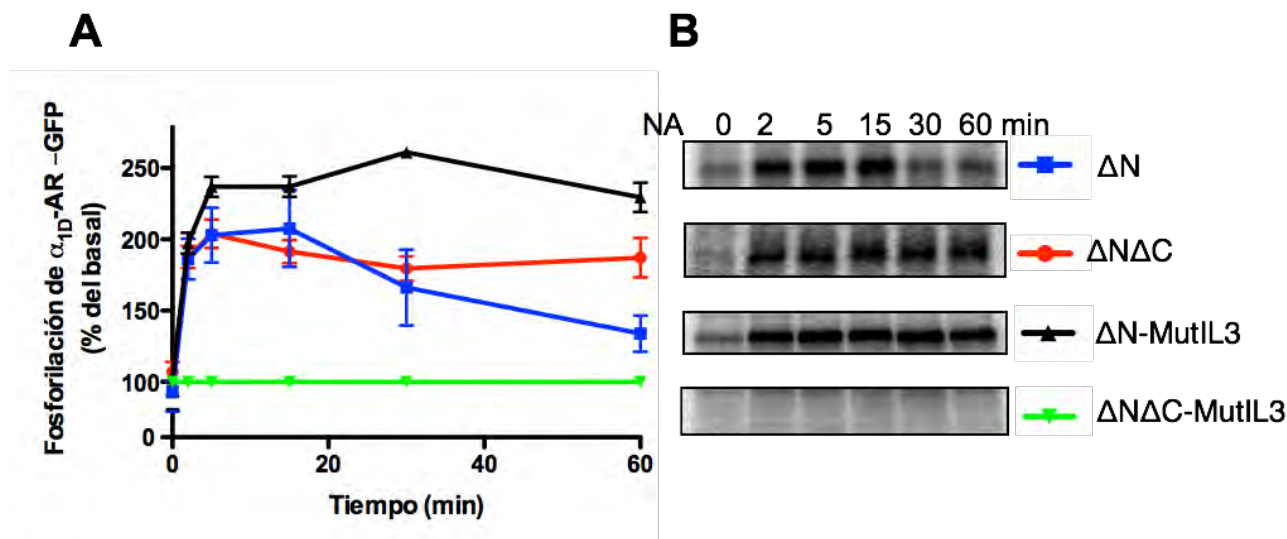


Figura 26. Cursos temporales de fosforilación de las mutantes del α_{1D} -AR en respuesta a noradrenalina. (A) Las células que expresan las distintas mutantes del α_{1D} -AR se estimularon con noradrenalina (NA) 10 μ M durante 2, 5, 15, 30 y 60 min. Se evaluó la fosforilación de receptores mediante marcaje radioactivo. Las respuestas se normalizaron respecto a su basal (tiempo cero) considerado como 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. (B) Imágenes representativas de la fosforilación de cada mutante obtenidas al revelar placas de autorradiografía.

Posteriormente evaluamos la fosforilación de las mutantes al activar farmacológicamente a la PKC con PMA para mimetizar un estado de desensibilización heteróloga del receptor. En la figura 27 se observa que el receptor ΔN incrementa su fosforilación desde los 2 min de estimulación con PMA y permanece así después de 5, 15, 30 y 60 min. Este comportamiento es consistente en las mutantes $\Delta N\Delta C$ y ΔN -mutIL3. Sin embargo, no detectamos fosforilación en la mutante total ($\Delta N\Delta C$ -mutIL3) durante el curso temporal de estimulación con PMA. Lo anterior sustenta el hecho de que el receptor se fosforila en dos dominios intracelulares. Por otra parte que durante la desensibilización heteróloga, el receptor también se fosforila específicamente en los residuos: S300, 323, 331, 332, 334 y T328.

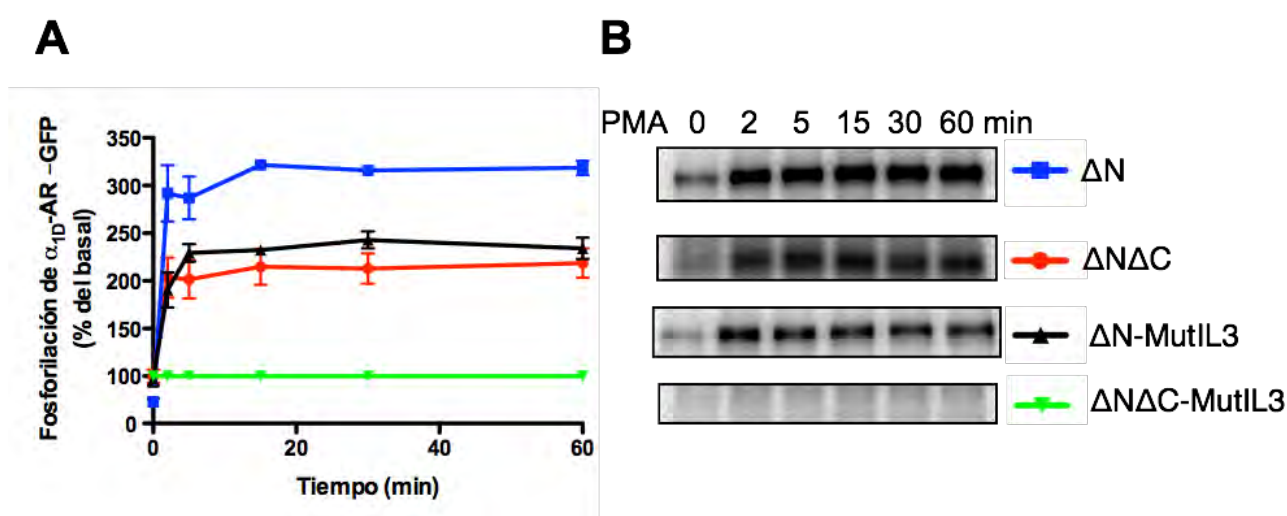


Figura 27. Cursos temporales de fosforilación de las mutantes del α_{1D} -AR en respuesta a forbol miristato acetato. (A) Las células que expresan las distintas mutantes del α_{1D} -AR se estimularon con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M durante 2, 5, 15, 30 y 60 min. Se evaluó la fosforilación de receptores mediante marcaje radioactivo. Las respuestas se normalizaron respecto a su basal (tiempo cero) considerado como 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. **(B)** Imágenes representativas de la fosforilación de cada mutante obtenidas al revelar placas de autorradiografía.

Los experimentos anteriores nos proporcionaron información clave sobre la variación en el estado de fosforilación de cada mutante respecto al tiempo. Los cambios fueron puestos en evidencia al graficar el porcentaje de fosforilación respecto al basal de cada mutante. Sin embargo, esta aproximación no nos permitió comparar la magnitud de esta modificación post-traducciona en las mutantes respecto al receptor ΔN . Por esta razón, evaluamos simultáneamente los niveles de fosforeceptores mutantes y respecto al truncado únicamente en el amino (ΔN). En la figura 28A se observa un incremento en los niveles de fosforeceptor ΔN en respuesta a un estímulo con NA y PMA durante 15 min.

Al compararlo con la mutante $\Delta N\Delta C$ con los mismos estímulos, éste siguió una cinética similar pero de menor magnitud. Lo mismo ocurrió al comparar la mutante de la tercera asa (ΔN -mutIL3) con el control positivo (ΔN) (Fig. 28B). Al evaluar la fosforilación de la mutante total ($\Delta N\Delta C$ -mutIL3) respecto al control, únicamente se encontró señal en este último, confirmando nuestros datos previos (Fig. 28C). Las bandas esperadas para las mutantes $\Delta N\Delta C$ y $\Delta N\Delta C$ -mutIL3 son de un menor peso molecular debido a la ausencia de la cola carboxilo del receptor. Los resultados previos indican que cada dominio independiente contribuye de forma proporcional con la fosforilación total del receptor.

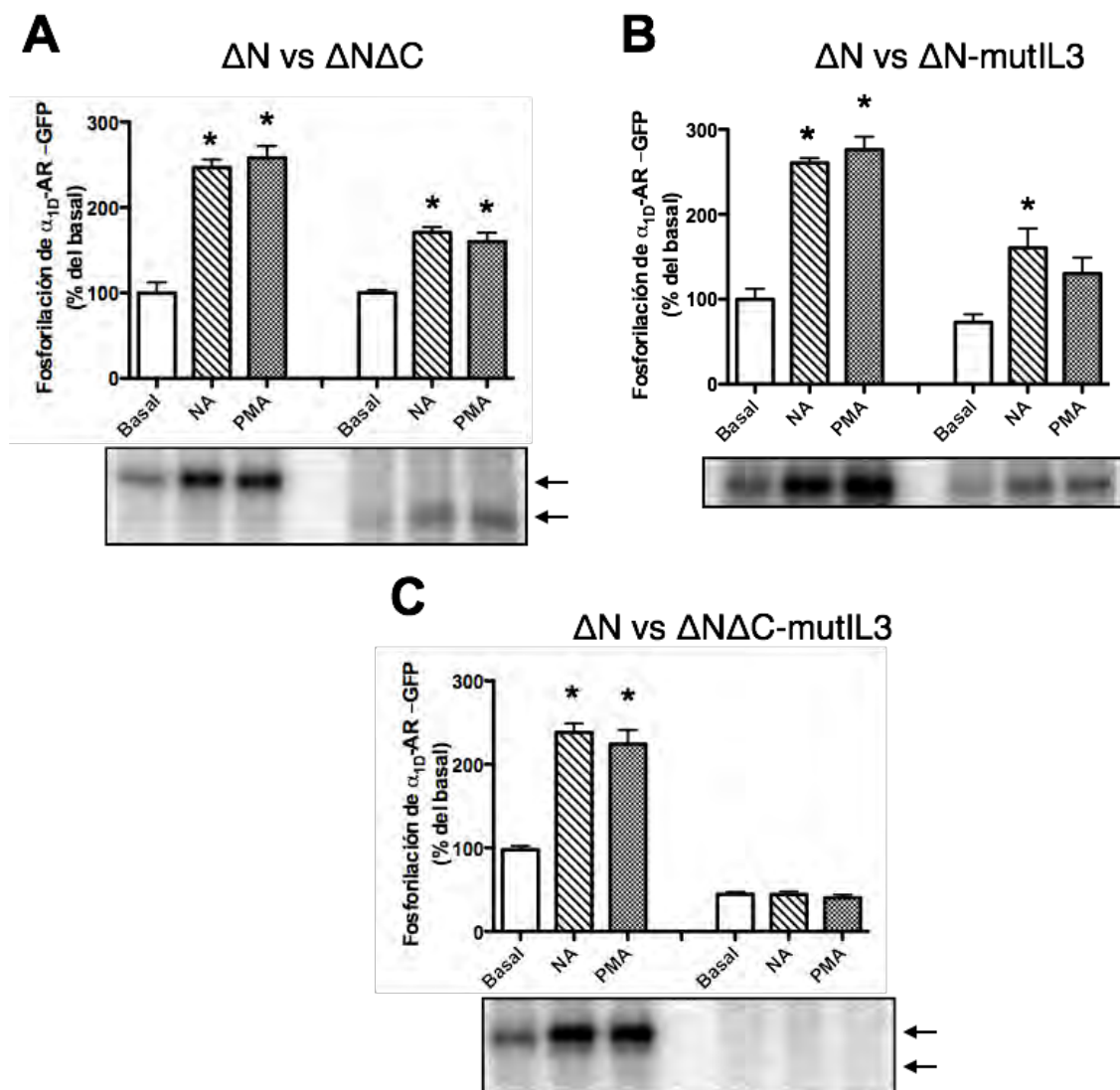
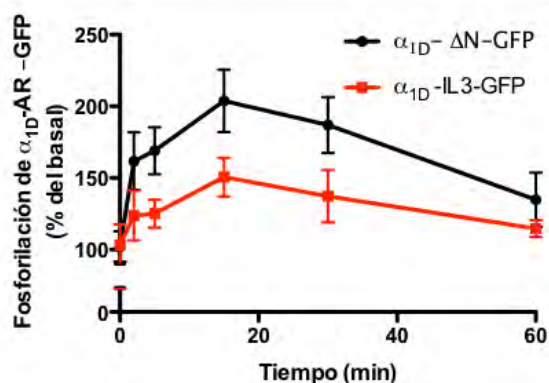
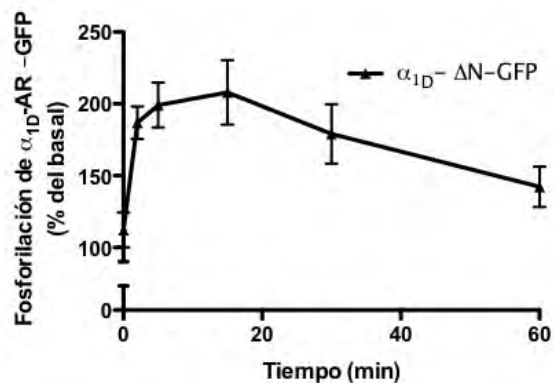
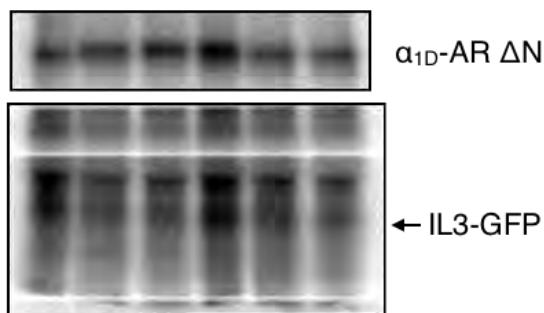


Figura 28. La fosforilación en la tercera asa intracelular y la región carboxilo del α_{1D} -AR es equitativa. Las células que expresan las distintas mutantes del α_{1D} -AR se estimularon con noradrenalina (NA) 10 μ M o con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M durante 15 min. Se comparó la fosforilación de receptores mediante marcaje radioactivo. **(A)** ΔN vs $\Delta N\Delta C$. **(B)** ΔN vs ΔN -mutIL3. **(C)** ΔN vs $\Delta N\Delta C$ -mutIL3. Las respuestas se normalizaron respecto a su basal (tiempo cero) considerado como 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 3-5 experimentos usando diferentes preparaciones celulares.* $p < 0.05$ vs su respectivo basal. Se muestran imágenes representativas de la fosforilación de cada mutante obtenidas al revelar placas de autorradiografía.

Posteriormente quisimos proporcionar evidencia adicional de la fosforilación específica de la tercera asa. Para lograrlo, transfectamos las células que expresan al receptor ΔN con una construcción que codifica específicamente para la IL3 fusionada a la GFP (IL3-GFP). Después realizamos un curso temporal de activación con NA y evaluamos la fosforilación del receptor y de la IL3 soluble (Fig. 29A). Al cuantificar la intensidad de fosforilación del receptor (banda de alto peso molecular), éste siguió un curso de activación muy similar al reportado previamente en la Figura 26. Es decir, un pico máximo transitorio a que volvió a niveles cercanos al basal luego de 60 min de activación con el agonista (Fig. 29A). Al cuantificar la banda correspondiente al peso esperado para la IL3-GFP soluble, también se detectó un incremento transitorio en la fosforilación que tiende al basal luego de 60 min de estímulo. La banda de menor peso molecular no se detectó cuando se evaluó la fosforilación únicamente del receptor (Fig. 29B), ni cuando se transfectó únicamente con la IL3 soluble (no mostrado). Las bandas de los paneles 29A se adquirieron del mismo gel pero de forma independiente, debido a que la intensa señal de fosforilación del receptor completo apagaba la señal del fragmento soluble de la IL3. Estos datos son una prueba experimental adicional de que la fosforilación del α_{1D} -AR también ocurre en la tercera asa intracelular.

A**B**

NA 0 2 5 15 30 60 min



NA 0 2 5 15 30 60 min

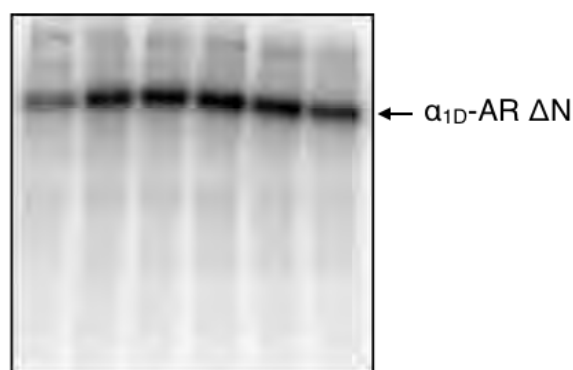


Figura 29. Fosforilación de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR. Las células que expresan al receptor α_{1D} -AR Δ N se transfectaron con (A) o sin (B) la tercera asa soluble del α_{1D} -AR (276-348) fusionada a GFP (IL3-GFP). Luego se estimularon con noradrenalina 10 μ M durante 2, 5, 15, 30 y 60 min. Se evaluó la fosforilación del receptor completo y de la IL3 soluble mediante marcaje radioactivo. Las respuestas se normalizaron respecto a su basal (tiempo cero) considerado como 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 3-5 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. (Panel inferior) Imágenes representativas de la fosforilación obtenidas al revelar placas de autorradiografía; la banda de mayor peso molecular corresponde al receptor completo; la de menor peso molecular (flecha) a la tercera asa soluble.

7.6 GRK2 y PKC α/β fosforilan al α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga.

De manera general se sabe que las cinasas de GPCRs (GRKs), fosforilan a los receptores durante su desensibilización homóloga, mientras que PKC hace lo propio durante el proceso heterólogo. Sin embargo, cada una es en realidad una familia con varios miembros. En el caso de GRKs, se han identificado 7 isoformas (Gurevich et al., 2012), mientras que para PKC, se han descrito 10 miembros en la familia (Wu-Zhang et al., 2013). Por tal motivo, nuestro siguiente objetivo fue identificar las isoformas involucradas en los dos procesos de desensibilización.

De acuerdo a la predicción de cinasas obtenida mediante el programa GPS 3.0 (Ver Tabla 4), la isoforma GRK2 se repitió un mayor número de veces, por lo que fue nuestra principal candidata. Para determinar la participación de GRK2, bloqueamos su actividad con paroxetina, un inhibidor altamente selectivo (Thal et al., 2012). El experimento consistió en preincubar las células con el inhibidor por 15 min y posteriormente estimular con NA o PMA por 15 min. Las células que recibieron los estímulos anteriores pero no fueron pretratadas con el inhibidor funcionaron como control positivo. Estas células control con el receptor truncado únicamente en el amino (ΔN) incrementaron sus niveles de fosforilación en respuesta a NA y PMA (Fig. 30A). Sin embargo, en las células con paroxetina la señal permaneció similar a los niveles basales incluso luego de los estímulos. Repetimos este experimento usando las mutantes $\Delta N\Delta C$ (Fig. 30B) y ΔN -mutL3 (Fig. 30C) y en todos los casos la paroxetina bloqueó el incremento de la fosforilación. Por lo que concluimos que específicamente GRK2 fosforila la tercera asa intracelular y la cola carboxilo del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga.

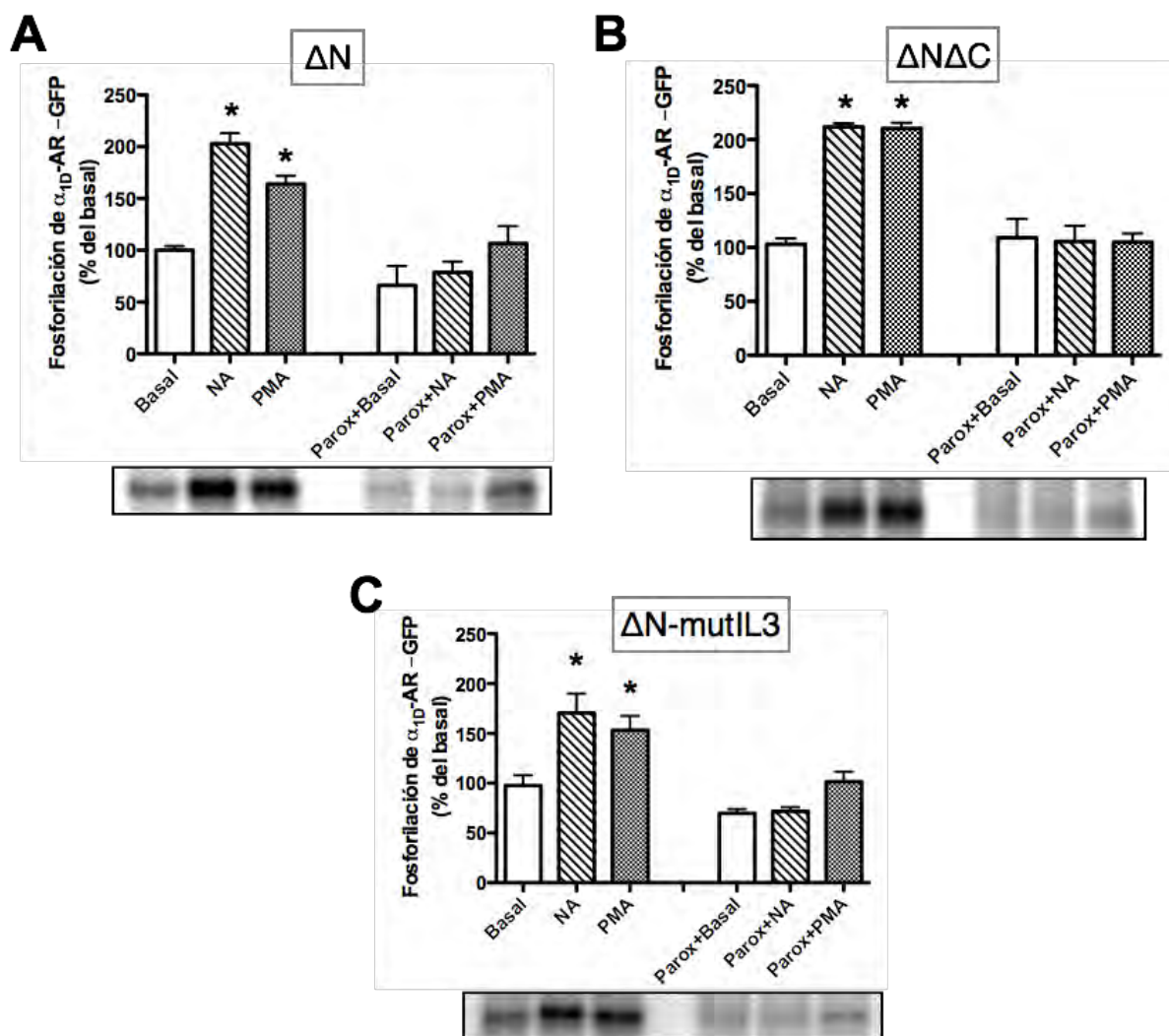


Figura 30. GRK2 fosforila la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR. Las células que expresan las distintas mutantes del α_{1D} -AR se incubaron en ausencia (lado izquierdo) o en presencia (lado derecho) del inhibidor de GRK2, paroxetina 10 μ M y posteriormente se estimularon con noradrenalina 10 μ M (NA) o con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M durante 15 min. Se comparó la fosforilación en ambas condiciones mediante marcaje radioactivo. **(A)** Receptores ΔN **(B)** $\Delta N\Delta C$. **(C)** ΔN -mutIL3. Las respuestas se normalizaron respecto a su basal (tiempo cero) considerado como 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 3-5 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.05$ vs su respectivo basal. Se muestran imágenes representativas de la fosforilación de cada mutante obtenidas al revelar placas de autorradiografía.

El siguiente paso fue identificar las isoformas involucradas en la fosforilación del receptor, esta vez durante su desensibilización homóloga. Nuevamente volvimos a los resultados del análisis *in silico* de predicción de cinasas (Tabla 4) y las isoformas que se repitieron mayor número de veces fueron PKC α y β . Nuestra primera aproximación fue el uso de BIM (bisindolilmaleimida), un inhibidor general de PKC. En la figura 31A observamos el incremento en la fosforilación del receptor silvestre en respuesta a NA y PMA. Al preincubar las células con el inhibidor de PKC y luego estimularlas, se detectó

únicamente un incremento en la fosforilación inducida por NA. Es decir, sólo el efecto de la activación farmacológica de PKC fue inhibido por BIM. Esta observación fue reproducible tanto en la mutante $\Delta N\Delta C$ (Fig. 31B) como en la ΔN -mutIL3 (Fig. 31C). Con estos resultados comprobamos la participación de la familia de PKC en la desensibilización heteróloga del receptor.

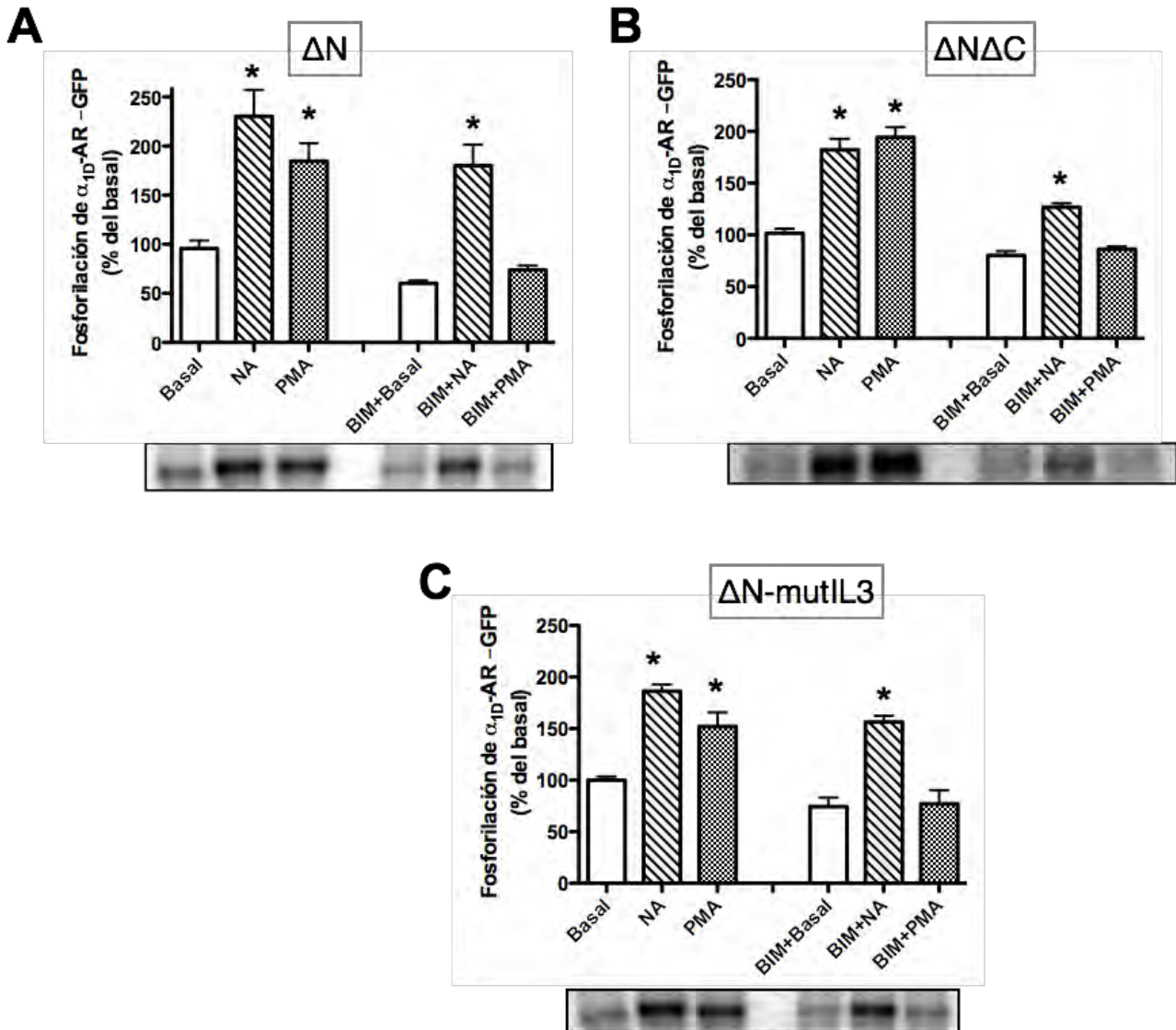


Figura 31. PKC fosforila la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR. Las células que expresan las distintas mutantes del α_{1D} -AR se incubaron en ausencia (lado izquierdo) o en presencia (lado derecho) del inhibidor general de PKC, bisindolilmaleimida (BIM) 1 μ M y posteriormente se estimularon con noradrenalina 10 μ M (NA) o con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M durante 15 min. Se comparó la fosforilación en ambas condiciones mediante marcaje radioactivo. **(A)** Receptores ΔN **(B)** $\Delta N\Delta C$. **(C)** ΔN -mutIL3. Las respuestas se normalizaron respecto a su basal (tiempo cero) considerado como 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.05$ vs su respectivo basal. Se muestran imágenes representativas de la fosforilación de cada mutante obtenidas al revelar placas de autorradiografía.

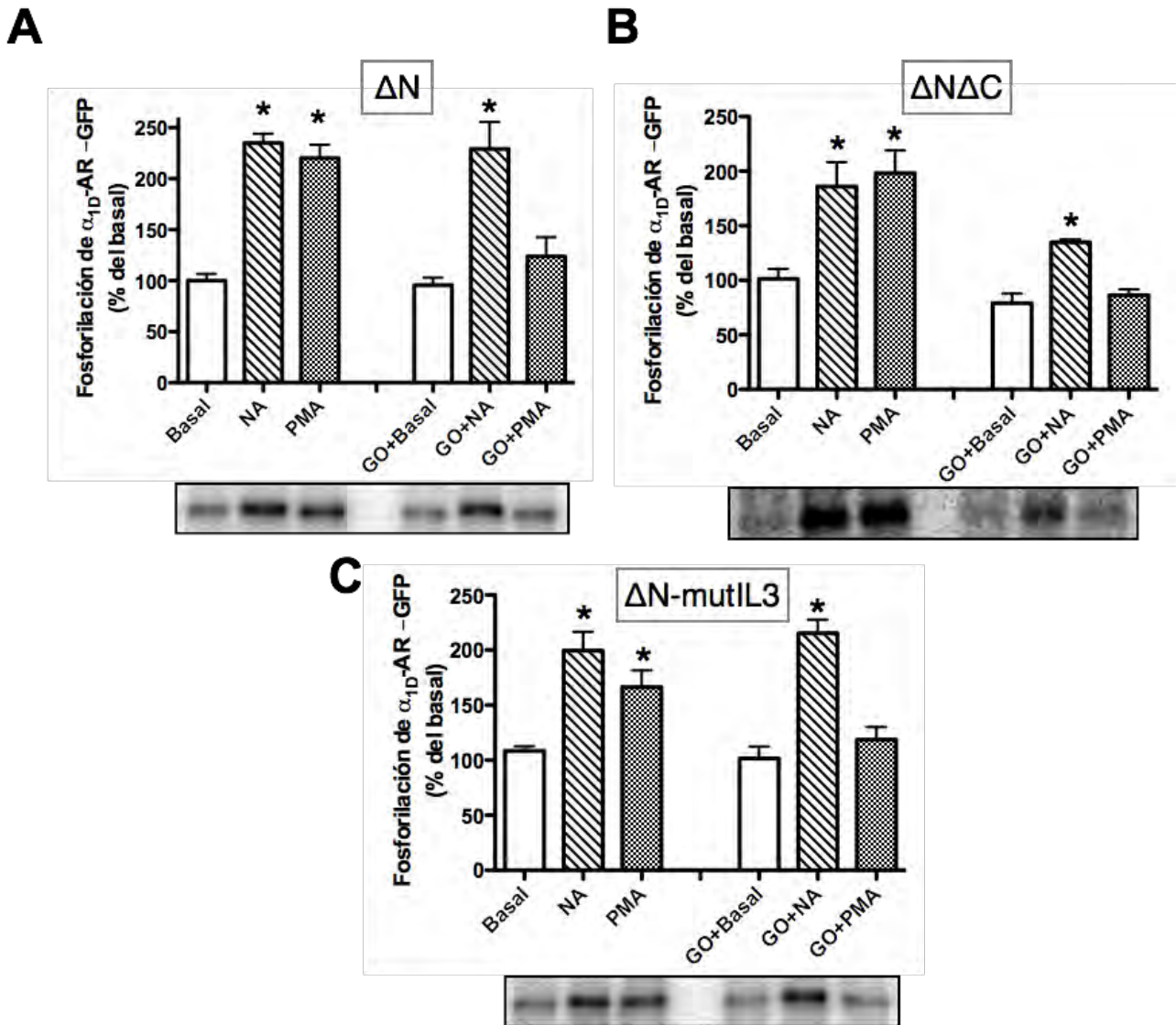


Figura 32. Papel de las isoformas α/β de PKC en la fosforilación de la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR. Las células que expresan las distintas mutantes del α_{1D} -AR se incubaron en ausencia (lado izquierdo) o en presencia (lado derecho) del inhibidor de PKC α/β , Gö6976 1 μ M y posteriormente se estimularon con noradrenalina 10 μ M (NA) o con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M durante 15 min. Se comparó la fosforilación en ambas condiciones mediante marcaje radioactivo. **(A)** Receptores ΔN **(B)** $\Delta N\Delta C$. **(C)** ΔN -mutL3. Las respuestas se normalizaron respecto a su basal (tiempo cero) considerado como 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 3-5 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.05$ vs su respectivo basal. Se muestran imágenes representativas de la fosforilación de cada mutante obtenidas al revelar placas de autorradiografía.

Para tener mayor información sobre las participación de PKC α y β empleamos Gö6976, un inhibidor específico de estas dos isoformas (Hernández-Méndez et al., 2014). Repetimos la estrategia experimental previa, esta vez utilizando el inhibidor de PKC α/β . Los resultados se muestran en la figura 32 y al igual que en la figura 31, se observa un abatimiento en la fosforilación inducida por PMA en las células preincubadas con Gö. Esto no ocurrió en las células estimuladas con NA, como se observó

previamente. Los controles positivos (NA y PMA) respondieron como se esperaba. Estos resultados fueron consistentes al analizar la fosforilación de las tres formas del receptor: ΔN , $\Delta N\Delta C$ y ΔN -mutL3 (Fig. 32 A, B y C, respectivamente). Es decir, se sugiere que PKC α/β fosforilan los residuos descritos de la tercera asa intracelular y de la región carboxilo del α_{1D} -AR durante su desensibilización heteróloga.

7.7 Residuos en la tercera asa intracelular y en la región carboxilo del α_{1D} -AR regulan la desensibilización de las señales de Ca^{2+} .

Hasta el momento describimos teórica y experimentalmente los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR, así como las posibles cinasas involucradas. Pero, también nos interesó entender las repercusiones funcionales de los sitios localizados específicamente en la tercera asa intracelular y el carboxilo terminal. Como se describió en la introducción, una de las vías de señalización que activa el α_{1D} -AR es la del recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} . Por lo anterior decidimos analizar el efecto de las mutaciones en los dominios intracelulares en la liberación máxima de Ca^{2+} intracelular y la atenuación de esta señal en respuesta al propio ligando (NA) y a factores no relacionados.

Como se muestra en la primera barra de la Figura 33A, las células que expresan la mutante de los sitios de la tercera asa intracelular (ΔN -mutL3) incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular (≈ 100 nM) al estimarse con NA. También las células que expresan la mutante truncada en el carboxilo ($\Delta N\Delta C$) incrementan los niveles de Ca^{2+} en respuesta al agonista con una magnitud similar (Fig. 33B, primera barra). Después evaluamos la repercusión funcional de las mutaciones en la desensibilización heteróloga del receptor. Estos experimentos consistieron en preincubar las células con PMA para activar farmacológicamente a PKC, quien fosforila al receptor. Posteriormente agregamos NA y evaluamos la concentración de Ca^{2+} intracelular. Probamos dos tiempos de incubación con PMA: 5 y 10 min. Observamos que luego de la incubación a estos dos tiempos, las células que expresan al receptor ΔN -mutL3 liberaron una modesta cantidad de calcio (≈ 25 nM) en respuesta a NA (Fig. 33A, barras 2 y 3). Es decir, los receptores se desensibilizaron a los dos tiempos probados. Sin embargo, la mutante $\Delta N\Delta C$ sólo se desensibilizó luego de 10 min de preincubación con PMA (Fig. 33B, barras 2 y 3). Estos datos sugieren por un lado una cinética de desensibilización diferencial atribuida a los dominios intracelulares estudiados. Por otro lado, los resultados indican una redundancia

en la función de dichos dominios, puesto que finalmente ambas mutantes se desensibilizan.

Adicionalmente analizamos la desensibilización homóloga de los receptores. Para lograrlo preincubamos las células con NA por 5 y 10 min. Luego lavamos las células para estimular nuevamente con NA y evaluar la liberación de Ca^{2+} . Para este tipo de atenuación no encontramos diferencias entre las mutantes, puesto que ambas se desensibilizaron totalmente a los dos tiempos analizados (Fig. 33A y B, carriles 4 y 5).

Para continuar con la caracterización, evaluamos la repercusión funcional de la inhibición de las cinasas que fosforilan al receptor en la tercera asa y el carboxilo (descritas previamente). Para lo anterior, primero incubamos las células con los inhibidores general y específico de PKC α/β (BIM y Gö, respectivamente). Luego incubamos con PMA y finalmente activamos los receptores con NA y medimos la liberación de calcio. En la figura 33A, barras 6 y 7, se observa que las células que expresan la mutante ΔN -mutIL3 y recibieron los tratamientos antes mencionados, respondieron al estímulo con NA. Se observó lo mismo con la mutante $\Delta N\Delta C$ (Fig. 33B barras 6 y 7).

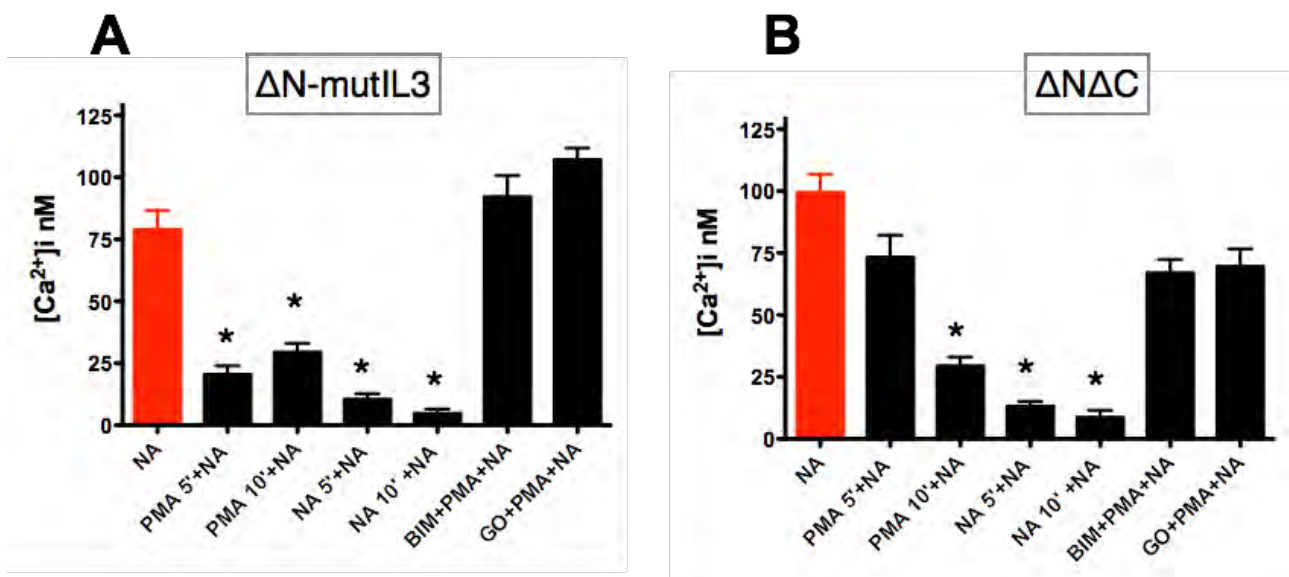


Figura 33. Repercusión funcional de las mutaciones de la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR en la desensibilización de las señales de calcio. Determinaciones de calcio intracelular usando las células HEK293 T-rex que expresan el α_{1D} -AR ΔN -mutIL3 (A) o $\Delta N\Delta C$ (B). Las células fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μM en ausencia o presencia de los tratamientos que se indican. PMA, forbol miristato acetato 1 μM ; BIM, bisindolilmaleimida 1 μM (inhibidor general de PKC), GÖ 1 μM (inhibidor de PKC α/β). Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de por lo menos 5 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.05$ vs su respectivo basal.

En otras palabras, la inhibición general de PKC o específicamente de las isoformas α/β evitó la desensibilización del receptor. Con estos resultados comprobamos funcionalmente que estas isoformas fosforilan al receptor específicamente en los dominios intracelulares descritos. Además, la desensibilización del receptor ocurrió independientemente de la mutación en uno u otro de sus dominios intracelulares (IL3 o COOH), por lo que nuevamente observamos una redundancia en su función. Es decir, la presencia de uno u otro dominio del receptor es suficiente para que se lleve a cabo la atenuación de las señales de calcio.

7.8 La fosforilación en los dominios intracelulares del α_{1D} -AR regula la vía de ERK.

Otra de las cascadas de señalización encendidas por el α_{1D} -AR es la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK), por lo que también analizamos el efecto de las mutaciones del α_{1D} -AR en esta vía. Las células que expresan al receptor ΔN fueron estimuladas con NA durante diferentes tiempos y posteriormente determinamos la fosforilación de ERK1/2 como medida de su activación. Observamos que las células que expresan el receptor ΔN se incrementó el estado de fosforilación de ERK1/2 luego de 2 y 5 min de estimulación con NA. Dicho pico disminuyó gradualmente hasta llegar a niveles cercanos al basal luego de 60 min (Fig. 34A). Por otro, evaluamos la activación de ERK mediada por NA en las mutantes $\Delta N \Delta C$ y ΔN -mutIL3. En ambas condiciones la fosforilación de ERK incrementó desde los 2 min de estimulación, pero permaneció aumentada en todos los tiempos analizados (Fig. 34B y C). De manera interesante, la mutante total ($\Delta N \Delta C$ -mutIL3) no sólo activó a ERK al igual que las otras mutantes estudiadas, sino que dicha activación también fue sostenida (Fig. 34D).

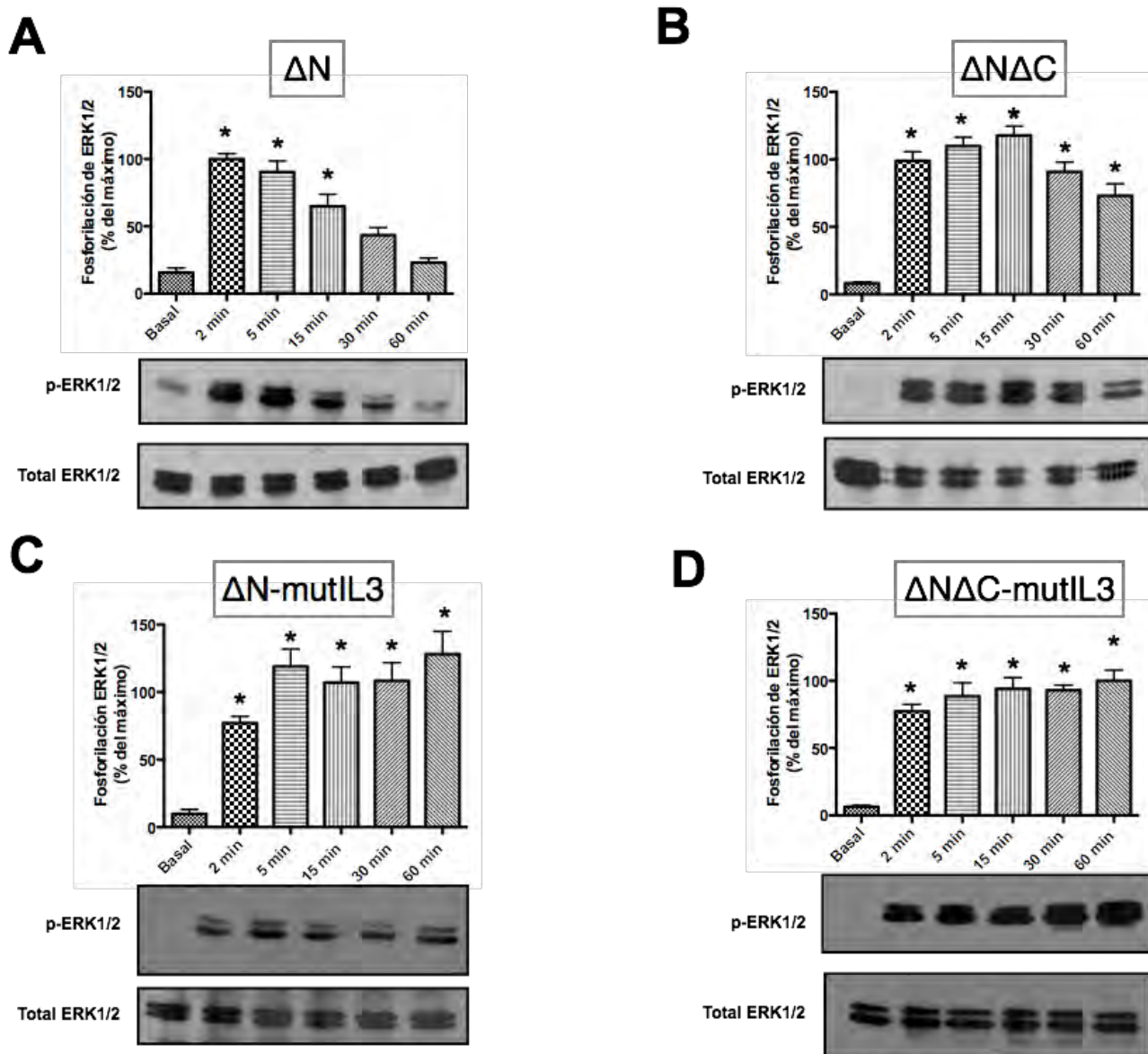


Figura 34. Efecto de las mutaciones de la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR en la vía de ERK. Las células HEK293 T-rex que expresan el α_{1D} -AR ΔN truncado solo en el amino (**A**), truncado en la región carboxilo $\Delta N\Delta C$ (**B**), mutado en los sitios de la tercera asa ΔN -mutIL3 (**C**) y $\Delta N\Delta C$ -mutIL3 (**D**) mutado en los sitios de la tercera asa y truncado en la región carboxilo, fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μM por 2, 5, 15 y 30 min. La fosforilación de ERK se detectó mediante Western blot. Las respuestas se normalizaron respecto al basal de cada experimento, considerado como 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 4-6 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.05$ vs su respectivo basal. Se muestra un Western blot representativo de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 total.

Los datos anteriores sugieren que la señalización mantenida se debe a la ausencia de fosforilación en los dominios intracelulares del receptor. Para comprobar esta hipótesis inhibimos a la cinasa involucrada en la desensibilización homóloga: GRK2. Esto lo logramos al transfectar las células que expresan al receptor ΔN con un plásmido que codifica para una forma dominante negativa (DN) de GRK2. Posteriormente

evaluamos la fosforilación de ERK1/2 luego de 5 ó 15 min de incubación con NA. En las células control, que expresan al receptor ΔN y que fueron transfectadas con un plásmido que codifica para la GFP soluble, se aprecia un incremento en los niveles de fosfo-ERK1/2 luego de 5 min. Las formas fosforiladas de ERK en estas células disminuyeron luego de 15 min de estimulación (Fig. 35). Sin embargo, en las células transfectadas con la dominante negativa de GRK2, la fosforilación de ERK1/2 se mantiene incluso después de 15 minutos de incubación con NA. En otras palabras, al inhibir GRK2 se reconstituyó el fenotipo de las mutantes de los sitios de fosforilación en los dominios intracelulares. Estos datos comprueban por una parte que la fosforilación por GRK2 de los dominios intracelulares del receptor regula la vía de ERK. Por otra, que esta regulación de la función no es redundante, puesto que basta mutar uno de los dominios para observar una activación sostenida de ERK.

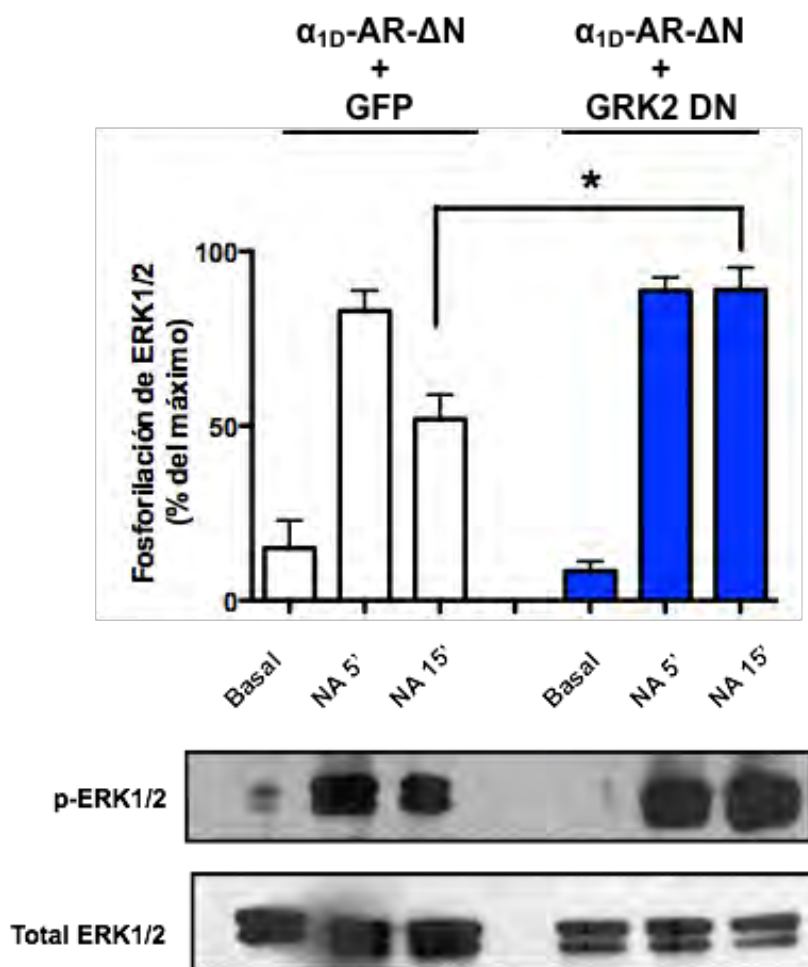


Figura 35. La inhibición de GRK2 mimetiza el fenotipo de las mutantes de la tercera asa y la región carboxilo del α_{1D} -AR en la vía de ERK. Las células HEK293 T-rex que expresan el α_{1D} -AR truncado en el amino (ΔN) fueron transfectadas con GFP (izquierda) o con la dominante negativa (DN) de GRK2 (derecha). Luego fueron estimuladas con noradrenalina (NA) $10 \mu M$ por 5 y 15 min. La fosforilación de ERK se detectó mediante Western blot. Las respuestas se normalizaron respecto al basal de cada experimento, considerado como 100%. Se muestra un Western blot representativo de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 total. * $p < 0.005$ entre las condiciones que se indican.

7.9 La tercera asa intracelular del α_{1D} -AR es suficiente para activar la vía de ERK.

Los datos presentados previamente sobre el análisis *in silico* del α_{1D} -AR revelaron que su tercera asa podría adquirir una estructura de α -hélice (Fig. 21). Primero obtuvimos información adicional sobre la posible estructura secundaria de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR. Para lograrlo, introdujimos la secuencia de amino ácidos 276-348 del ortólogo de humano en los siguientes programas: JPred, CFSSP, NetsurfP, SOPMA, GOR4 y Swiss Model. Estas herramientas bioinformáticas predicen α -hélices y hojas β plegadas. En la figura 36A se muestran las secuencias correspondientes a la tercera asa del α_{1D} -AR; en verde se indican las regiones con probables α -hélices. Los resultados de todos los programas empleados sugieren que hay dos regiones con alta probabilidad de estructura de α -hélice.

A

		Tercera asa intracelular (IL3)	
		276	348
Programa			
JPred	RVYVVAR	STTRSLEAGVKRER	GKASEVVLRIHCRGAATGADGAHGMRS
CFSSP	RVYV	VARSTTRSLEAGVKRER	GKASEVVLRIHCRGAATGADGAHGMRS
NetsurfP	RVYVVAR	STTRSLEAGVKRER	GKASEVVLRIHCRGAATGADGAHGMRS
SOPMA	RVYVVA	RSTTRSLEAGVKRER	GKASEVVLRIHCRGAATGADGAHGMRS
GOR4	RVYVVAR	STTRSLEAGVKRER	GKASEVVLRIHCRGAATGADGAHGMRS
Swiss Model 1	RVYVVAR	STTRSLEAGVKRER	GKASEVVLRIHCRGAATGADGAHGMRS
Swiss Model 2	RVYVVAR	STTRSLEAGVKRER	GKASEVVLRIHCRGAATGADGAHGMRS

B



SPINDLE AND KINETOCHORE-ASSOCIATED PROTEIN 3
21.74%

C



DNA REPLICATION FACTOR CDT1
23.53%

Figura 36. Predicción de la estructura secundaria de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR. (A)

Regiones de la tercera asa intracelular α_{1D} -AR con predicción de α -hélice (en verde) de acuerdo a los programas indicados. (B) Modelo 3D de una región de la tercera usando como templado la proteína asociada al cinetocoro-3 (C) Modelo 3D de una región de la tercera usando como templado el factor de replicación de DNA CDT1. Se indica el porcentaje de homología estructural.

Después, empleamos el programa Swiss Model para obtener una predicción en 3D específicamente de la tercera asa intracelular. Por lo que nuevamente introdujimos la secuencia de amino ácidos 276-348. Indicamos al programa que realizara la predicción con base a la estructura ya cristalizada más parecida. Encontramos sólo dos proteínas con homología estructural con la IL3: la proteína asociada al huso mitótico y al cinetocoro 3 y el factor de replicación CDT1, con 21.74% y 23.53% de homología, respectivamente. Primero obtuvimos la predicción de la estructura de la tercera asa utilizando como templado la proteína asociada a cinetocoro. El resultado se muestra en la figura 36B, donde se observan un par de α -hélices separadas por una breve asa; esta región va desde los residuos 284 a 306. El programa no predijo estructura para el resto de la secuencia (Ver Fig.36A, Swiss Model 1). Luego obtuvimos la predicción usando como templado la otra proteína con homología estructural, CDT1. Se observa la presencia de una α -hélice que va desde los residuos 327 a 343 (Fig. 36C). El programa no predijo estructura secundaria para el resto de la secuencia. (Fig. 36A, Swiss Model 2). Estos resultados son consistentes con las regiones estructurales predichas en la tercera asa por las herramientas de la Figura 36A y con el modelo generado al usar el receptor completo (Fig. 21). Además, varios de los sitios de fosforilación que encontramos mediante el uso de MS se localizan en estas hélices.

Se ha reportado que fragmentos solubles de GPCRs tales como algunos segmentos transmembranales y la tercera asa intracelular pueden funcionar como moduladores alostéricos de receptores (Covic et al., 2002; O'Callaghan et al., 2012). Tomando en cuenta estos reportes y las predicciones estructurales anteriores en la tercera asa intracelular del receptor, decidimos evaluar la participación específica de este dominio en la activación de la vía de ERK. Para lo anterior, generamos proteínas solubles que por un lado tuvieran la GFP como etiqueta. Por otro lado la región 276-348 que corresponde a la tercera asa intracelular del receptor (IL3-WT-GFP) (Fig. 37A). Debido a que varios de los sitios de fosforilación que reportamos previamente se encuentran en esta zona, probamos la posibilidad de una regulación adicional mediada por esta modificación post-traducciona. Por lo que generamos dos proteínas solubles adicionales: una con los residuos de serina mutados por alanina, para evitar su fosforilación (IL3-S/A-GFP); otra con sustituciones de serina por aspartato para mimetizar un estado constitutivo de fosforilación de la tercera asa (IL3-S/D-GFP) (Fig. 37A). Posteriormente transfectamos células HEK293 con estas construcciones y evaluamos el estado general de activación de ERK al estimular con ácido lisofosfatídico (LPA). Utilizamos como control la transfección del gen que codifica para la proteína verde

fluorescente (GFP). En la Figura 37B se observa que en las células control, ERK está ligeramente fosforilada en condiciones basales. Dicha fosforilación se incrementa en respuesta al estímulo con LPA. Sin embargo, en las células que expresan la fusión IL3-WT, la fosforilación de ERK está incrementada desde el estado basal y no aumenta considerablemente luego del estímulo con LPA. Lo mismo ocurre en las células que expresan las proteínas IL3-S/A-GFP y IL3-S/D-GFP. No encontramos cambios en los controles de carga (ERK total) ni en los controles de transfección (GFP). Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR es suficiente para encender la vía de ERK1/2 y que dicha activación es independiente del estado de fosforilación de la IL3.

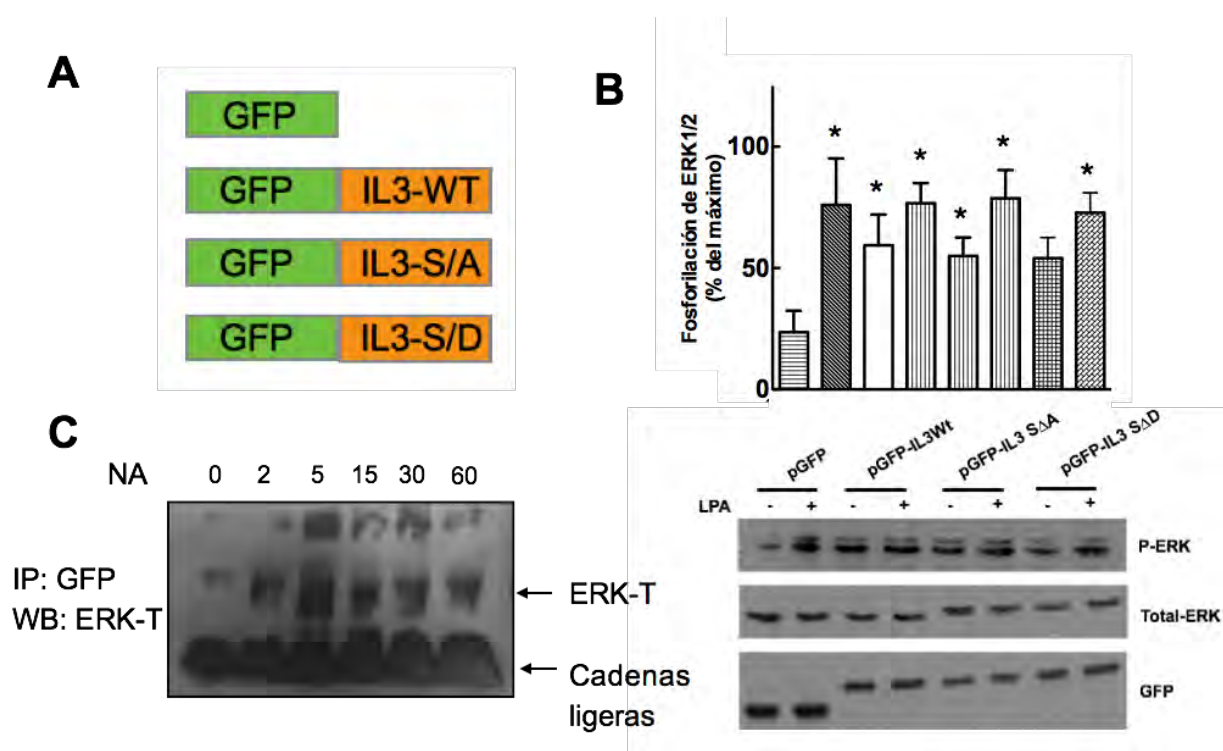


Figura 37. Efecto de la expresión de formas solubles de la tercera asa del α_{1D} -AR en la vía de ERK. (A) GFP soluble o proteínas quiméricas GFP con la tercera asa intracelular: Wt, silvestre; S/A, mutaciones de residuos de serina por alanina; S/D, mutaciones de residuos de serina por ácido aspártico. **(B)** Las células HEK293 transfectadas de forma transitoria con las mutantes de **(A)**, se incubaron en presencia o ausencia de ácido lisofosfatídico (LPA) 1 μ M. Se evaluó la fosforilación de ERK1/2 por Western Blot. Valores normalizados respecto al máximo. Se muestran blots representativos de fosfo-ERK1/2, ERK2 total y GFP. **(C)** Inmunoprecipitación de extractos de células que expresan al α_{1D} -AR silvestre estimuladas con noradrenalina 10 μ M por 2, 5, 15 y 30 min. Se reveló la presencia de ERK total. Blot representativo. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 3-5 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. * $p < 0.05$ vs su respectivo basal.

Adicionalmente, nos preguntamos si el encendido de la vía de ERK tenía una correlación con su interacción con el receptor. Para demostrar lo anterior, realizamos un curso temporal de estimulación con NA en células que expresan al receptor α_{1D} -GFP silvestre. Luego inmunoprecipitamos al receptor con un anticuerpo específico contra GFP y revelamos mediante un ensayo de Western blot la presencia de ERK total. En la figura 37C se observa un incremento en la detección de ERK desde los 2 min de estimulación con NA y que se mantiene a todos los tiempos evaluados. Estos datos indican que la activación del receptor incrementa la presencia ERK en el mismo complejo de proteínas. Es decir, que el α_{1D} -AR y ERK interaccionan.

7.10 Los dominios intracelulares del α_{1D} -AR regulan su localización y tráfico vesicular.

Finalmente, evaluamos la repercusión de las mutaciones en los dominios intracelulares del α_{1D} -AR en su localización subcelular y tráfico vesicular. Mediante microscopía confocal analizamos la expresión de las diferentes mutantes del receptor fusionadas a la proteína verde fluorescente en las células del sistema T-rex. En la figura 38A se observa que la distribución del receptor α_{1D} -GFP ΔN es mayoritariamente en la membrana plasmática. Lo mismo se aprecia en el caso de la mutante de los sitios de la tercera asa intracelular (ΔN -mutL3) (Fig. 38C). Sin embargo, tanto el receptor truncado en el carboxilo ($\Delta N\Delta C$), como la mutante total ($\Delta N\Delta C$ -mutL3), se localizaron en la membrana plasmática pero también intracelularmente en forma abundante (Fig. 38B y D).

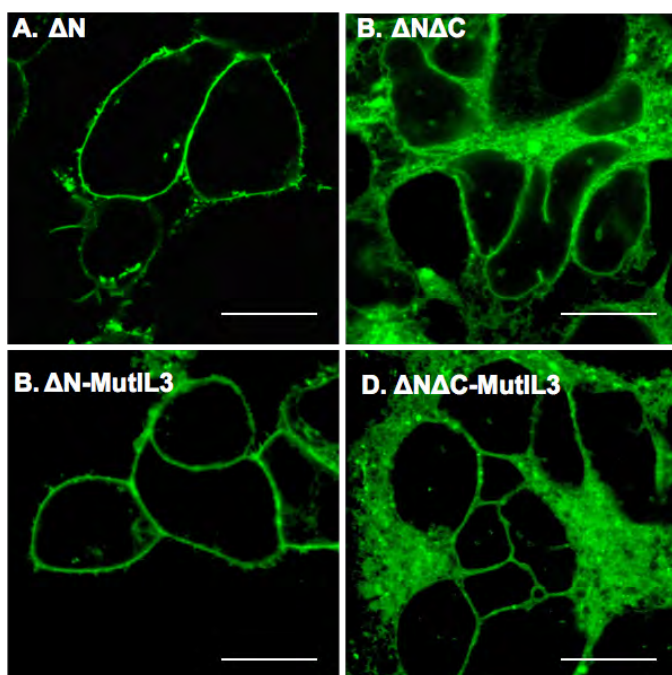


Figura 38. Evaluación de la expresión de las mutantes del α_{1D} -AR mediante microscopía confocal. Receptores (A) truncado en el amino, ΔN (B) truncado en las regiones amino y carboxilo, $\Delta N\Delta C$ (C), truncado en el amino y mutado en los sitios de la tercera asa, ΔN -mutL3 y (D) mutado en los sitios de fosforilación de la tercera asa y truncado en las regiones amino y carboxilo, $\Delta N\Delta C$ -mutL3. Imágenes de microscopía confocal. Receptor en verde. La barra de calibración representa 10 μ M.

Después evaluamos la internalización del receptor α_{1D} -GFP Δ N durante su desensibilización. Para analizar la desensibilización homóloga realizamos un curso temporal de estimulación con NA y posteriormente fijamos las células. En la figura 39A se observa la expresión del receptor Δ N en la membrana plasmática en condiciones basales. La cantidad de fluorescencia intracelular (vesículas) incrementa desde los 5 min y continúa a los 15 y 30 min (indicado con flechas). Sin embargo, luego de 60 min de incubación con el agonista, el receptor se localiza nuevamente en la membrana plasmática. Para analizar la desensibilización heteróloga, realizamos el experimento de internalización al activar farmacológicamente a PKC con PMA. Nuevamente observamos la presencia del receptor mayoritariamente en la membrana plasmática (Fig. 39B), pero la fluorescencia intracelular incrementó sólo luego de 30 y 60 min de incubación con PMA. Es decir, el mismo receptor (Δ N), mostró cinéticas diferenciales de internalización durante su desensibilización homóloga y heteróloga.

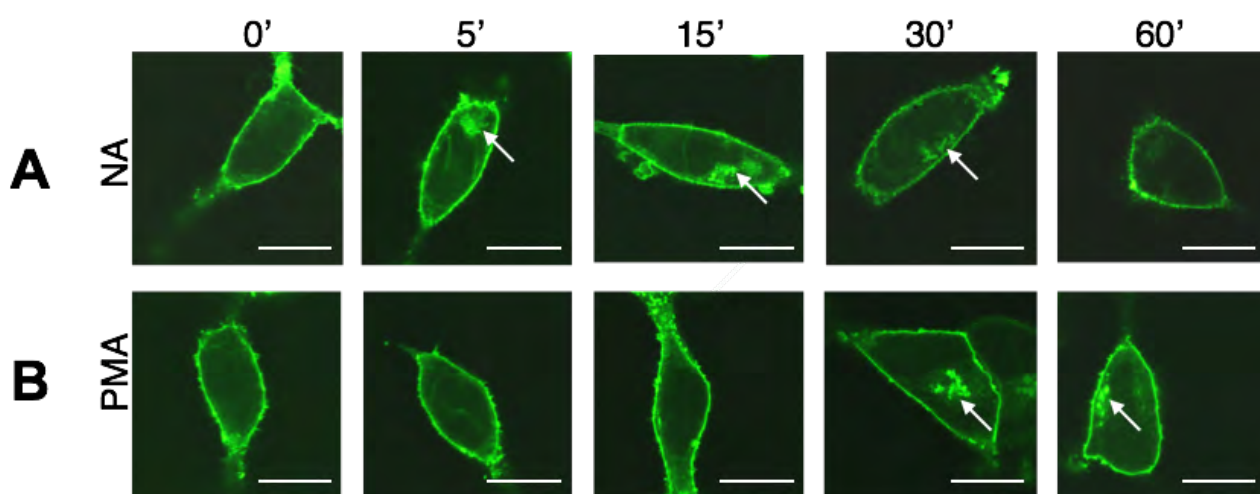


Figura 39. Internalización del α_{1D} -AR Δ N durante su desensibilización homóloga y heteróloga.

Las células HEK293 T-rex que expresan el α_{1D} -AR truncado en el amino (Δ N) fusionado con GFP fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μ M (**A**) o con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M (**B**) durante 5, 15, 30 y 60 min. Imágenes de microscopía confocal. Con flechas se indica la presencia de vesículas intracelulares. La barra de calibración representa 10 μ M. Se realizaron los experimentos por triplicado.

Para determinar el papel específico de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR y sus residuos fosforilables, utilizamos la mutante Δ N-mutL3. Esta mutante únicamente contiene las sustituciones S300/323/331/332/334A/T328V en la tercera asa pero el carboxilo intacto. Al incubar las células que expresan a esta mutante con NA, se observó un incremento gradual en la fluorescencia intracelular desde los 5 min, que continúa a

los 15 min y 30 min. A diferencia del receptor ΔN , en la mutante ΔN -mutIL3 también se observaron receptores internalizados luego de 60 min de activación con NA (Fig. 40A). Es decir, el receptor se mantiene internalizado incluso a tiempos prolongados. En cambio, la cinética de internalización de la mutante ΔN -mutIL3 (Fig. 40B) en respuesta a PMA, fue similar a la del receptor ΔN (Fig. 39B).

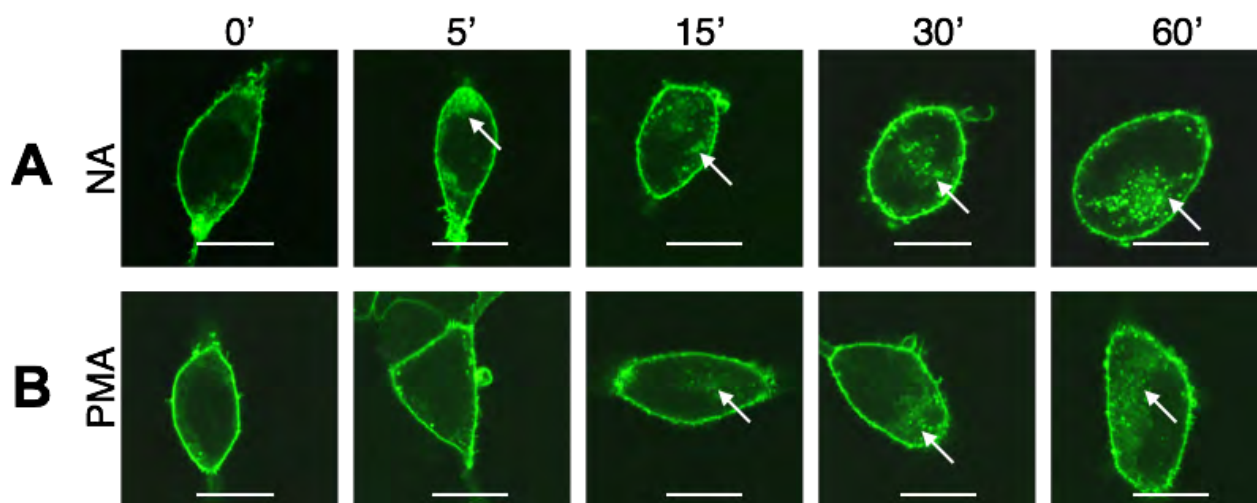


Figura 40. Internalización del α_{1D} -AR ΔN -mutIL3 durante su desensibilización homóloga y heteróloga. Las células HEK293 T-rex que expresan el α_{1D} -AR mutado en la tercera asa (Δ IL3) y fusionado con GFP fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10 μ M (**A**) o con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M (**B**) durante 5, 15, 30 y 60 min. Imágenes de microscopía confocal. Con flechas se indica la presencia de vesículas intracelulares. La barra de calibración representa 10 μ M. Se realizaron los experimentos por triplicado.

Para evaluar el rol específico de la región carboxilo del α_{1D} -AR y sus residuos fosforilables, utilizamos la mutante $\Delta N\Delta C$ expresada de forma transitoria en células HEK293. Esta mutante está truncada en sus extremos amino y carboxilo. Debido a que encontramos que esta mutante también se localiza en vesículas intracelulares además de en la membrana plasmática en las células del sistema T-rex (Fig. 38B), usamos células vivas y un marcador de membrana (rojo) para comparar su internalización respecto al receptor silvestre. En la Figura 41, se observa la internalización del receptor silvestre luego de 10 min de estimulación con PMA. En este caso, no se detecta colocalización entre el marcador del membrana (rojo) y el receptor (verde). Es decir, el receptor se internalizó. En cambio, la mutante truncada en el carboxilo ($\Delta N\Delta C$) permanece en la membrana plasmática incluso 10 min después de la incubación con PMA. Al realizar el empalme de canales entre el marcador de membrana (rojo) y el receptor (verde). En otras palabras, la región carboxilo del receptor parece ser necesaria para su internalización por desensibilización heteróloga.

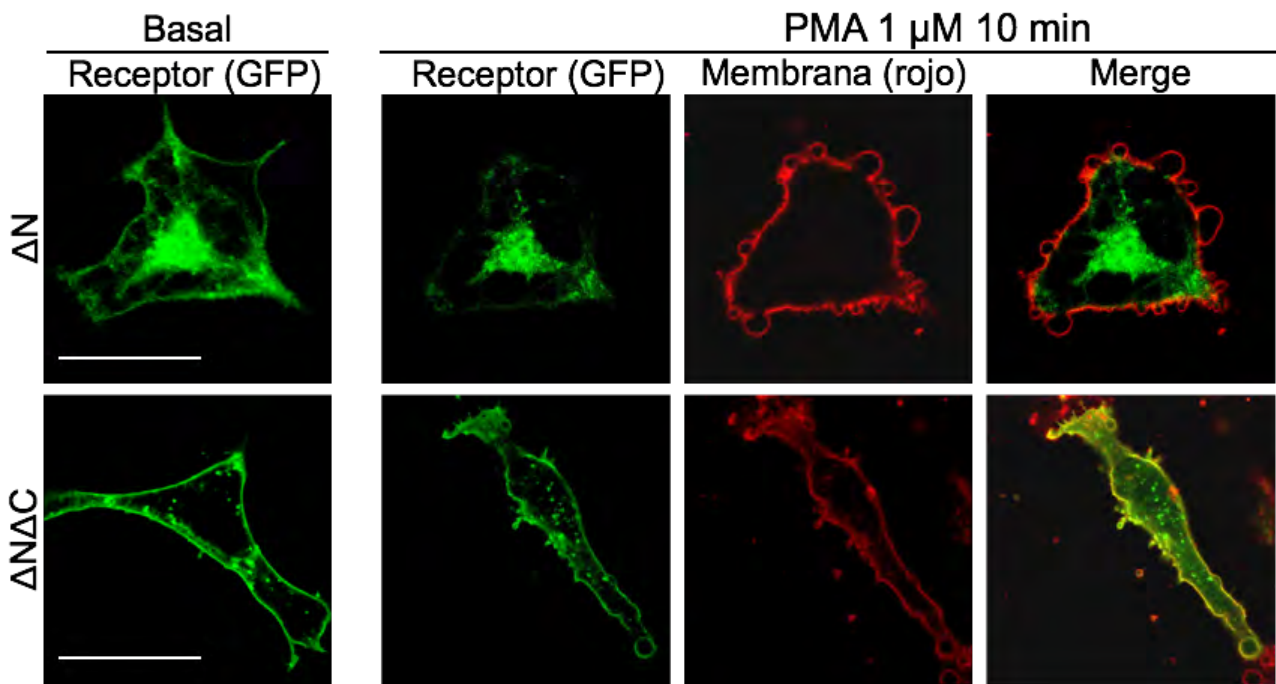


Figura 41. La región carboxilo del α_{1D} -AR se requiere para su internalización. Células HEK293 transfectadas de forma transitoria con el α_{1D} -AR truncado en el amino (Δ N) o truncado en el amino y el carboxilo (Δ N Δ C) (ambos fusionados a GFP). Se estimularon con forbol miristato acetato (PMA) 1 μ M, se capturaron imágenes por 10 min. La membrana está teñida con FM464 (rojo). Receptores en verde. Merge: empalme de canales verde y rojo. La barra de calibración representa 10 μ M. Se realizaron los experimentos por triplicado.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

Parte I: Caracterización de las propiedades de señalización del α_{1D} -AR truncado en su región carboxilo.

- En fibroblastos Rat-1 que expresan receptores α_{1D} adrenérgicos truncados en la región amino, la adrenalina activa tanto a la vía de la MAPK/ERK como la de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{++} .
- Los receptores α_{1D} truncados en la región carboxilo activan la vía de de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} pero no la vía de ERK, por lo que describimos un mutante de receptor con actividad sesgada.
- La mutante mencionada anteriormente no sólo bloqueó el efecto adrenérgico, sino también el de otros receptores acoplados a proteínas G y receptores con actividad de cinasa de tirosina endógenos. También se bloqueó el efecto de la activación farmacológica de PKC. Por lo anterior, reportamos que esta mutante carente de la región carboxilo tiene actividad dominante negativa para la vía de ERK.
- El efecto de dominante negativa de la vía de ERK es reproducible en células B103, pero no en HEK293.
- Como parte del mecanismo encontramos que:
 - La activación de ERK es dependiente de PKC en las células Rat-1 (Fig. 42).
 - La señalización de las cinasas río arriba de ERK (MEK1 y Raf-1) también se bloquea.
 - La inhibición de la vía de ERK ocurre entre PKC y Raf-1 (Fig. 43).
 - La sobre expresión de la tercera asa intracelular del RA- α_{1D} . no mimetiza el efecto de la delección del carboxilo, pero es suficiente para activar la vía MAPK/ERK.

Parte II: Identificación y caracterización funcional de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga.

- Se purificó el α_{1D} -AR para su análisis para espectrometría de masas.
- Identificamos los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga: ello mostró distintos códigos de fosforilación (Fig. 44).
- Los sitios de fosforilación se localizaron específicamente en la región carboxilo y la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR.
- Las dominios intracelulares del α_{1D} -AR tienen distintos perfiles de fosforilación.
- GRK2 y PKC α/β son las principales cinasas que fosforilan al receptor durante su desensibilización homóloga y heteróloga respectivamente.
- Residuos en la tercera asa intracelular y en la región carboxilo del α_{1D} -AR regulan diferencialmente la desensibilización de las señales de Ca^{++} .
- La fosforilación en los dominios intracelulares del α_{1D} -AR regula la vía de ERK.
- La tercera asa intracelular del α_{1D} -AR es suficiente para activar la vía de ERK.
- Los dominios intracelulares del α_{1D} -AR regulan su localización y tráfico vesicular.

9. DISCUSIÓN

Parte I: Caracterización de las propiedades de señalización del α_{1D} -AR truncado en su región carboxilo.

La mayor contribución de la primera parte del presente trabajo es el haber encontrado que el receptor α_{1D} adrenérgico truncado en sus extremos amino y carboxilo ($\Delta N\Delta C$) es capaz de activar la vía de señalización de recambio de fosfoninosítidos/ Ca^{2+} , pero la señalización de ERK se encuentra alterada (Alfonzo-Méndez et al, 2016). Nuestros datos indican que la actividad de este receptor es sesgada. Por un lado, la sola expresión de la mutante $\Delta N\Delta C$ significativamente disminuyó la señalización de una de las ramas de la vía de la MAP cinasas: ERK1/2. Lo anterior ocurre no sólo a través del propio receptor, sino también a través de otros GPCRs no relacionados, receptores con actividad de tirosina cinasa (EGFR) e incluso a través de la activación farmacológica de PKC. Por otro lado, la sola expresión de la mutante $\Delta N\Delta C$ fue suficiente para activar otra rama de la vía de la MAP cinasa: p38. Tanto el agonista natural, noradrenalina, como la activación farmacológica de PKC, fueron incapaces de incrementar aún más la fosforilación de p38. Lo anterior sugiere que el receptor α_{1D} $\Delta N\Delta C$ se comporta como una mutante constitutivamente activa para esta rama de la vía de la MAP cinasa.

Cabe resaltar que en esta tesis se utilizó una mutante del receptor α_{1D} adrenérgico truncado en la región amino con la finalidad de incrementar su localización en membrana plasmática. Además, la señalización de esta mutante fue similar a lo reportado previamente para otros GPCRs (Pupo et al., 2003, Rodríguez-Pérez et al., 2009). Por lo tanto, los cambios observados con la mutante truncada también en la región carboxilo pueden ser atribuidos a la ausencia de este dominio.

A este respecto, se ha estudiado previamente la activación de ERK mediada por receptores silvestres (Pérez-Aso et al., 2013) y existen similitudes con los datos presentados en este trabajo. Sin embargo, los experimentos de Pérez-Aso y colaboradores fueron realizados en células HEK293. En este caso, la fosforilación de ERK no fue afectada por la inhibición de PKC. Es posible que las diferencias entre las células utilizadas expliquen los diferentes papeles de PKC en el efecto adrenérgico y esto pueda relacionarse con el hecho de que la expresión de la mutante α_{1D} $\Delta N\Delta C$ en células HEK293 no altera la fosforilación de ERK.

A la fecha, no ha sido reportada ninguna mutación en GPCRs capaz de inhibir la vía de la MAP ERK. Sin embargo, hay evidencia de que mutantes de otras proteínas involucradas en señalización e incluso proteínas de andamiaje tienen efectos en la

activación de MAP cinasas. Entre ellas se encuentran: β -arrestina 3 y glutatión S-transferasa P1 (Breitman et al., 2012, Okamura et al., 2015). Se sabe que las proteínas de andamiaje β -arrestina se unen a GPCRs durante su desensibilización o cambio de señalización y que además estas proteínas pueden regular la vía de la MAP cinasa (Lefkowitz, 2013). A este respecto, Breitman y colaboradores reportaron la interacción de GPCRs con distintas mutantes de β -arrestina y la MAP cinasa JNK3 (c-Jun N-terminal Kinase 3, por sus siglas en inglés). Además describen que esta proteína de andamiaje es capaz de regular a JNK. Entre las mutantes utilizadas en este estudio, una que contiene 12 substituciones claves en residuos de alanina fue incapaz de unirse a receptores β_2 -adrenérgicos pero sí de inhibir la activación de JNK3. Es decir, describen una mutante dominante negativa para la vía de JNK3. De manera similar, se reportó recientemente que la fosforilación en tirosinas mediada por EGFR de la glutatión S-transferasa P1, favorece su interacción con JNK y de esta manera inhibe la señalización cascada abajo de esta vía. (Okamura et al., 2015). Además, se ha observado que los receptores β_2 -adrenérgicos se unen a proteínas asociadas a membrana llamadas MAGI-3, y que dicha asociación retarda sustancialmente la activación de ERK (Yang et al., 2013).

Se sabe que los α_{1D} -ARs son fosforilados y desensibilizados en respuesta a la activación farmacológica de PKC mediada por ésteres de forbol (García-Sáinz et al., 2001, García-Sáinz et al., 2004, Rodríguez-Pérez et al., 2009). Estos efectos fueron observados tanto en células que expresan el receptor silvestre, así como las mutante ΔN y $\Delta N\Delta C$ de este trabajo. Por lo tanto, PKC es funcional tanto en las células que expresan la mutante ΔN como $\Delta N\Delta C$. En estas células, demostramos que la activación ERK es dependiente de PKC, como se probó al utilizar el BIM-I, un inhibidor general de PKC. Además, los ensayos para determinar el estado de fosforilación de las cinasas intermedias, Raf-1 y MEK, indicaron que la vía de señalización se encuentra bloqueada río abajo de PKC.

Es interesante que la cinasa Raf-1 sea modulada por fosforilación vía PKC (Kolch et al., 1993, Kolch, 2000). Por otro lado, a la activación e inhibición de Raf-1 vía GPCRs también se ha asociado a las subunidades $\beta\gamma$, la fosfoinosítido 3 cinasa (PI3K) y Akt, entre otras proteínas de señalización (Slupsky et al., 1999, Kolch, 2000, Merighi et al., 2006). Raf es un proto-oncogen que participa en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Kolch, 2000). La vía Ras/Raf/MEK representa un punto de regulación maestro de importancia en la fisiología y la fisiopatología, así como en la

transformación maligna (Knight e Irving, 2014). Por lo anterior, podría representar un blanco terapéutico para este tipo de alteraciones. Sin embargo, es importante considerar las distintas isoformas de Raf (Beeram et al., 2005). Además, Raf-1 es capaz de interactuar con una gran variedad de elementos, tales como receptores, proteínas G, proteínas de andamiaje, componentes del citoesqueleto, chaperonas, cinasas y fosfatasas, entre otras (Kolch, 2000). Raf-1 está localizado dentro de un gran complejo de proteínas en su estado inactivo; Ras activo se une con gran afinidad a Raf-1 y de esta manera participa en su activación y localización (Kolch, 2000).

En este trabajo no observamos una disminución en la abundancia de la proteína Raf-1 en extractos de células que expresan la mutante $\alpha_{1D} \Delta N-\Delta C$ en comparación con las células que expresan la mutante ΔN . Por lo tanto, un cambio en la función más que una alteración en la cantidad de proteína parece ser responsable del efecto de dominancia negativa para la vía de ERK.

Llama la atención que ambos receptores causan una liberación máxima de calcio y una desensibilización de la señal de magnitud similar. Sin embargo, al analizar las concentraciones de calcio por tiempos prolongados, sólo la mutante ΔN alcanza niveles cercanos al basal luego del estímulo. Esto sugiere que el receptor $\Delta N \Delta C$ podría regular la recaptura de calcio. A este respecto Álvarez-Curto et al (2016), describieron una señalización similar mediada por el receptor para ácidos grasos 4 (FFA4) mutado en sus sitios de fosforilación en la región carboxilo y también al bloquear la expresión de β -arrestina1/2 mediante CRISPR/Cas9. El $\alpha_{1D} \Delta N \Delta C$ carece del carboxilo y los sitios de fosforilación contenidos en esta región, por lo que este dominio podría ser importante para la unión con β -arrestina1/2. Es probable que la ausencia de esta interacción y la relación con los sitios de fosforilación sean los responsables de la señalización sostenida de la mutante mantenida $\Delta N \Delta C$. Sin embargo no podemos descartar la participación adicional de proteínas que sensan la entrada de calcio, como STIM1 (Ambudkar et al., 2016)

Cabe mencionar que la región carboxilo del receptor α_{1D} es particularmente largo (167 aa en el ortólogo humano). A este respecto, existe la posibilidad de que la ausencia de esta región del receptor deje nuevos dominios expuestos, los cuales podrían interactuar directa o indirectamente con miembros de la vía de la MAP cinasa. A la fecha, la estructura cristalográfica del receptor α_{1D} no ha sido resuelta y existe poca información referente a la estructura de las colas carboxílicas de GPCRs en general. Nuestra hipótesis de trabajo es que la ausencia de la región carboxilo permite la

exposición de nuevos sitios en el receptor que interaccionan con Raf-1 o proteínas asociadas, previniendo de esta manera su fosforilación y activación. Por default, al estar presente solamente la cola carboxilo del receptor, estos sitios permanecerían “ocultos”. Sin embargo, esta es una hipótesis y se requiere de mayor información experimental para demostrarlo. Adicionalmente, análisis *in vitro* e *in celullo* de interacción de MAP cinasas y proteínas de andamiaje relacionadas podrían ayudar a aceptar o refutar dicha hipótesis. De manera similar, ensayos tipo “pull-down” usando fragmentos del receptor como carnadas y experimentos de doble híbrido podrían darnos pistas clave adicionales. En este sentido, es claro que mayor trabajo estructural se requiere para entender la función de los receptores de siete dominios transmembranales.

Parte II: Identificación y caracterización funcional de los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga.

La mayor contribución de la segunda parte de esta tesis fue que identificamos por primera vez los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR y el papel de dichos sitios en su señalización y desensibilización. Específicamente, localizamos los sitios en la tercera asa intracelular (IL3) y la región carboxilo del receptor y describimos distintos patrones de fosforilación que cambiaron dependiendo del estímulo. Demostramos que estos patrones juegan un papel central en la regulación de las señales de calcio, ERK y el tráfico vesicular del receptor. Además, identificamos a GRK2 y PKC α/β como las principales cinasas involucradas en estos procesos.

De la familia de receptores α_1 , únicamente se han descrito los sitios de fosforilación del subtipo α_{1B} -AR de hámster (Diviani et al., 1997). En este trabajo, Diviani y colaboradores reportaron la fosforilación de las Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸, y Ser⁴¹⁰ al estimular al receptor con su ligando, noradrenalina. También identificaron la fosforilación de los residuos Ser³⁹⁴ y Ser⁴⁰⁰ durante la desensibilización heteróloga del receptor inducida por ésteres de forbol. Los sitios fueron localizados exclusivamente en la región carboxilo del receptor y están conservados en el ortólogo de humano pero no en el subtipo α_{1D} -AR de humano aquí reportado. Lo anterior sugiere que los sitios de fosforilación particulares de cada receptor la familia, podrían ser los responsables de la regulación diferencial de su señalización. Para obtener los datos anteriores, Diviani et al, analizaron la repercusión de los posibles sitios al sustituirlos por alanina mediante mutagénesis sitio-dirigida. Sin embargo, el uso de esta estrategia individual deja abierta la posibilidad de la

participación de sitios adicionales. Por lo anterior, en este proyecto utilizamos una combinación de análisis *in silico*, espectrometría de masas (MS) y mutagénesis sitio-dirigida.

Al purificarse los receptores y someterse a espectrometría de masas, tanto la secuencia de aminoácidos como los sitios de fosforilación pueden ser determinados simultánea e inequívocamente. Por esta razón, la MS ha sido utilizada para el estudio de diversos GPCRs (Tabla 2). El receptor mejor caracterizado al usar esta herramienta es el β_2 -adrenérgico, puesto que se han descrito sus sitios de fosforilación al usar fragmentos purificados de bacterias en ensayos *in vitro* (Doronin et al., 2001), en respuesta a distintos ligandos en células de mamífero (Trester-Zedlitz et al., 2005) e incluso existen datos cuantitativos sobre la magnitud de la fosforilación en los sitios identificados (Nobles et al., 2011). En el presente trabajo, logramos purificar una cantidad suficiente del α_{1D} -AR para el análisis por MS. Para lo cual, utilizamos extractos de células HEK293 con el sistema de expresión inducible Flp In T-rex. Este sistema ha sido empleado para el estudio de la regulación receptores de ácidos grasos en nuestro laboratorio (Sánchez-Reyes et al., 2014; Sosa-Alvarado et al., 2015) y también por otros grupos para el análisis de estos receptores por MS (Butcher et al., 2014; Prihandoko et al., 2016).

Los resultados arrojados por el análisis de MS revelaron un código de fosforilación del α_{1D} -AR en su estado basal (Tabla 5). Este código cambió durante la sensibilización inducida por el propio agonista (homóloga) o por factores no relacionados (desensibilización homóloga). Estos datos son consistentes con la hipótesis propuesta por primera vez por Butcher et al., 2011 en estudios con el receptor muscarínico M_3 , donde describen la existencia de patrones de fosforilación que cambian de acuerdo al agonista. Si bien nosotros reportamos sitios de fosforilación tanto en la tercera asa intracelular (IL3), como en la región carboxilo del α_{1D} -AR, el patrón cambió sólo en este último dominio. Cabe mencionar que al comparar los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR obtenidos mediante MS con los arrojados por las herramientas bioinformáticas, encontramos que estas últimas tuvieron una certeza de alrededor de 50% (Fig. 24). Es decir, los análisis *in silico* proporcionan una aproximación para el estudio de los sitios de fosforilación de proteínas.

Al analizar los perfiles de fosforilación de las mutantes generadas luego de comparar los resultados de MS y análisis *in silico*, encontramos que los sitios en la tercera asa intracelular y la región carboxilo del receptor contribuyen en la fosforilación de forma similar. En otras palabras, las mutantes con sólo uno u otro dominio mutado aún

son capaces de fosforilarse en respuesta a los estímulos probados, pero en menor magnitud. De manera importante, sólo encontramos un abatimiento total de la fosforilación en la mutante de todos los sitios ($\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -mut IL3). De esta manera comprobamos experimentalmente que el α_{1D} -AR se fosforila específicamente en las Ser³⁰⁰, Ser³²³, Ser³³¹, Ser³³², Ser³³⁴ y Thr³²⁸ en la tercera asa intracelular y en las Ser⁴⁸⁶, Ser⁴⁹², Ser⁵¹⁵, Ser⁵¹⁶, Ser⁵¹⁸, Ser⁵⁴³ y en las Thr⁴⁴², Thr⁴⁴⁷, y Thr⁵⁰⁷.

De manera adicional, comprobamos experimentalmente la fosforilación de la tercera asa intracelular al hacer ensayos de fosforilación de formas solubles de este dominio intracelular fusionado a la proteína verde fluorescente (IL3-GFP). Nuestros resultados son consistentes con la presencia de sitios reportados mediante MS en la tercera asa del receptor β_2 -adrenérgico (Gao et al., 2014), el V2 de vasopresina (Wu et al., 2008) y el de dopamina D2 (Jeong et al., 2013). Comprobamos la fosforilación de la tercera asa intracelular y nuestros datos apoyan otros reportes que muestran que este dominio es indispensable en la función de otros GPCRs, como el receptor del polipéptido intestinal vasoactivo (Langer et al., 2005) y el receptor M3 muscarínico (Butcher et al., 2011).

En esta investigación observamos la señalización diferencial del α_{1D} -AR al mutar de forma independiente ya sea su región carboxilo o los residuos en la tercera asa intracelular. Prihandoko et al., 2016 identificaron cinco sitios de fosforilación formando dos conglomerados o *clusters* en la región carboxilo del receptor a ácidos grasos FFA4: 1) Thr³⁴⁷, Thr³⁴⁹ y Ser³⁵⁰ y 2) Ser³⁵⁷ and Ser³⁶¹. Además encontraron que el grupo 1 regula en mayor medida la vía de señalización de Akt, mientras que el grupo 2 participa principalmente en la unión de la proteína de andamiaje β -arrestina 2 y en la internalización de este receptor a ácidos grasos. Es decir, existe un nivel de regulación más fino en la señalización y puede ser mediada por residuos cercanos entre sí dentro de un mismo dominio intracelular. Entre los sitios reportados para el α_{1D} -AR en este trabajo, encontramos también dos conglomerados en la región carboxilo: 1) Thr⁴⁷⁷, Ser⁴⁸⁶, Ser⁴⁹² y 2) Thr⁵⁰⁷, Ser⁵¹⁵, Ser⁵¹⁶, Ser⁵¹⁸. Estos datos marcan la pauta para realizar experimentos adicionales y comprobar la implicación funcional de los grupos de sitios en la señalización del α_{1D} AR.

En este trabajo también identificamos a GRK2 y PKC α/β como las principales cinasas responsables de generar los distintos códigos de fosforilación del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga y heteróloga. Validamos las predicciones hechas por las herramientas bioinformáticas utilizando una aproximación farmacológica. Para el

caso de PKC empleamos un inhibidor general y uno selectivo para las isoformas α/β . Al usar estos inhibidores, observamos no sólo la disminución de la fosforilación del receptor en respuesta específica a ésteres de forbol, sino también una pérdida en capacidad de desensibilización de las señales de calcio. Es decir, demostramos funcionalmente el papel de PKC α/β . Estos resultados son similares a los reportados en nuestro laboratorio para el caso de los receptores de ácido lisofosfatídico 1 (Hernández-Méndez et al., 2014) y esfingosina 1-fosfato (Morquecho-León et al., 2014). Para demostrar el papel de GRK2, usamos paroxetina, un inhibidor de alta especificidad para esta isoforma para el cual se ha reportado incluso una estructura cristalográfica de GRK2 unida al inhibidor (Thal et al., 2012). La paroxetina también bloqueó la fosforilación del α_{1D} AR, en este caso mediada por su propio agonista, noradrenalina. Si bien nuestros datos a este respecto son concluyentes, queda la posibilidad de abordar esta pregunta con otras aproximaciones como la interferencia de la expresión de las isoformas. Además, no podemos descartar la participación de otras cinasas.

Por otro lado, además de los sitios de fosforilación del α_{1D} AR, nuestros datos de espectrometría de masas revelaron proteínas asociadas (Tabla 7). No obstante, ninguna de estas proteínas coinciden con las reportadas previamente (Tabla 3). Es probable que estas diferencias se deban a las distintas técnicas empleadas para la detección. Por ejemplo, la proteína filamina C, cuya asociación se identificó mediante ensayos de doble híbrido (Zhang et al., 2004) o la proteína multifuncional gC1qR, detectada por coimmunoprecipitación con el receptor (Pupo et al., 2003). También es posible que las interacciones sean dependientes del tipo celular, puesto que la mayoría de las proteínas asociadas descritas previamente se encontraron en células de músculo liso de aorta (Lyssand et al., 2008) y en el presente estudio utilizamos la línea celular derivada de riñón de embrión humano, HEK293. Llama la atención que varias de estas nuevas proteínas asociadas al α_{1D} -AR tienen su función canónica en el núcleo celular. Por ejemplo, el factor de replicación de DNA MCM7 o la helicasa Ddx1 (Tabla 7). A este respecto, se ha descrito que los otros dos subtipos de la familia de receptores α_1 adrenérgicos, α_{1A} -AR y α_{1B} -AR, pueden localizarse en el núcleo de miocitos cardiacos (Wright et al., 2008). Además, se sugiere que estos dos receptores pueden regular la activación de ERK desde el núcleo, puesto que estas señales no se inhiben con el uso de bloqueadores α_1 impermeables a la membrana plasmática (Wright et al., 2008). Sin embargo, no existen reportes de una función y localización similar en el caso del α_{1D} -AR.

Por lo anterior, se requiere mayor investigación no solo para validar las nuevas proteínas asociadas aquí descritas, sino para determinar su función en el núcleo celular.

Resultó interesante que al analizar dos vías de transducción activadas por el α_{1D} -AR, identificamos que las señales son mediadas por sus dominios intracelulares. Las mutaciones individuales ya sea de la tercera asa (ΔN -mut IL3) o de la región carboxilo ($\Delta N\Delta C$) del receptor no tuvieron un efecto en la liberación máxima de calcio intracelular. Sin embargo, mostraron diferentes cinéticas de desensibilización, al ser más lenta la del la mutante $\Delta N\Delta C$. Pese a tener estas cinéticas distintas, las dos mutantes arriba mencionadas alcanzan el máximo de desensibilización a tiempos largos, por lo que concluimos que la regulación de esta función es redundante. Por otro lado, al evaluar la cinética de activación de la vía ERK, observamos que la mutante ΔN (truncada en el amino) encendió transitoriamente esta vía, como se ha reportado para receptores silvestres (Pérez-Aso et al, 2013). Mientras que en las mutantes de la tercera asa (ΔN -mut IL3), la región carboxilo ($\Delta N\Delta C$) y la mutante total ($\Delta N\Delta C$ -mut IL3), la señal de ERK permaneció encendida. Es decir, la mutación de uno de los dominios fue suficiente para alterar la señalización. En este sentido, Bray et al., 2014, identificaron los sitios de fosforilación en la cola carboxilo del receptor del neuropéptido FF2. También evaluaron el efecto de las mutaciones de los sitios fosforilables de este receptor en la vía de ERK y las compararon con el receptor silvestre; no obstante, no encontraron diferencias en las cinéticas de activación de esta cascada. Lo anterior sugiere mecanismos distintos de control de esta vía. En el caso del α_{1D} -AR, la regulación de ERK mediada por los dominios intracelulares estudiados parece no ser redundante.

De forma inesperada, la sobre-expresión de formas solubles de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR fue suficiente para activar la vía de ERK. Una hipótesis para explicar este fenómeno es que la tercera asa intracelular se comporta como un elemento de andamiaje de la cascada de ERK. Se han reportado múltiples proteínas de andamiaje que unen directamente a las cinasas activadas por mitógenos, las acercan entre sí regulan y de esta manera facilitan su interacción funcional (Ramos, 2007). La estequiometría relativa de una proteína de andamiaje respecto a sus proteínas de unión puede tener efectos dramáticos. Esto es, al aumentar la cantidad de proteína de andamiaje, la señalización también puede incrementar (Levchenko et al., 2000). A su vez, se ha descrito la unión de distintas proteínas de andamiaje entre sí, lo que sugiere un nivel adicional de regulación (Casar y Crespo, 2016). La proteína de andamiaje más estudiada en el contexto de la señalización de GPCRs es β -arrestina, que puede unirse

tanto al receptor como a Raf-1, MEK1 y ERK1/2 (Dhanasekaran et al., 2007). Nuestros datos muestran por un lado que el receptor se encuentra dentro del mismo complejo de proteínas que ERK. Por otro lado, los modelos de la estructura tridimensional de la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR sugieren que adquiere una conformación de alfa hélice. Por lo anterior, es posible que la tercera asa intracelular funcione como proteína de andamiaje de la vía de ERK. No obstante, se requiere mayor evidencia experimental para sustentar esta hipótesis.

Finalmente, en este trabajo reportamos por primera vez la internalización del α_{1D} -AR durante su desensibilización homóloga (NA) y heteróloga (PMA). Encontramos cinéticas diferenciales de internalización: la estimulación con NA provocó una internalización rápida y transitoria, mientras que la internalización con PMA fue más lenta y sostenida. Nuestros resultados durante la desensibilización homóloga del α_{1D} -AR son similares a los reportados para la isoforma α_{1B} -AR (Pérez-Aso et al., 2013; Castillo-Badillo et al., 2012). De manera interesante, encontramos que tanto el receptor con las sustituciones S/A en la tercera asa intracelular (ΔN -mut IL3) como el receptor carente de la región carboxilo ($\Delta N\Delta C$), su internalización también es lenta y sostenida. Con estos datos podemos atribuir las diferencias entre las cinéticas de los estímulos a los distintos códigos de fosforilación identificados en esta tesis. Sin embargo, quedan por determinar los mecanismos moleculares de internalización relacionados a la presencia de los sitios diferenciales de fosforilación. Por ejemplo, estudiar el rol de las cinasas descritas en este trabajo u otras proteínas asociadas que regulan el tráfico vesicular de GPCRs como la β -arrestina (Stanasila et al., 2008) o proteínas Rab (Castillo-Badillo et al., 2015; Alfonzo-Méndez et al., 2017).

Es así que el papel de los dominios intracelulares del α_{1D} -AR va más allá de la señalización y el proceso de desensibilización. Se ha observado que un dominio llamado PDZ, localizado en la cola carboxilo del α_{1D} -AR se asocia con una proteína llamada sintrofina (Chen et al., 2006); el *knock out* de esta proteína resulta en la pérdida de la acción adrenérgica del α_{1D} -AR en músculo liso de aorta (Lyssand et al., 2008). Este subtipo de receptor adrenérgico participa en la regulación de la presión arterial y en la patogénesis de la hipertensión arterial (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996, Villalobos-Molina et al., 1999). Por lo tanto, el conocimiento sobre los dominios funcionales del receptor, podrían ayudar a entender mejor esta enfermedad y de esta manera diseñar agentes terapéuticos más efectivos.

10. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en esta tesis muestran que ciertos dominios intracelulares, de forma particular la tercera asa intracelular y la región carboxilo del α_{1D} -AR regulan su función a distintos niveles. Por un lado contribuimos en la caracterización de la vía de activación de ERK mediada por el α_{1D} -AR (Fig. 42), por otro describimos que los receptores truncados en el carboxilo terminal, no sólo activan preferentemente una cascada de señales, sino que pueden inhibir la vía de ERK (Fig. 43). Es decir, la ausencia o presencia de los dominios es suficiente para alterar las propiedades de señalización de receptores.

Además, identificamos los sitios específicos de fosforilación del α_{1D} -AR durante dos condiciones fisiológicas: al activarse al receptor por su propio agonista (desensibilización homóloga) o por factores no relacionados (desensibilización heteróloga) (Fig. 44). Estos sitios de fosforilación fueron distintos en ambas condiciones y se localizaron específicamente en la tercera asa intracelular y la región carboxilo del receptor. Además, las principales cinasas involucradas en la fosforilación de los dominios intracelulares fueron GRK2 (Fig. 45) y PKC α/β (Fig. 46). Por lo que, para que se lleven a cabo distintas respuestas celulares, la regulación del receptor incluye mecanismos más finos como las modificaciones post-traduccionales de sus dominios. Los receptores de siete dominios transmembranales son blanco de alrededor del 40% de los fármacos en el mercado. Por tal motivo, mayor investigación relacionada a entender la relación estructura/función de estos receptores, podría ayudar al desarrollo de más y mejores opciones terapéuticas.

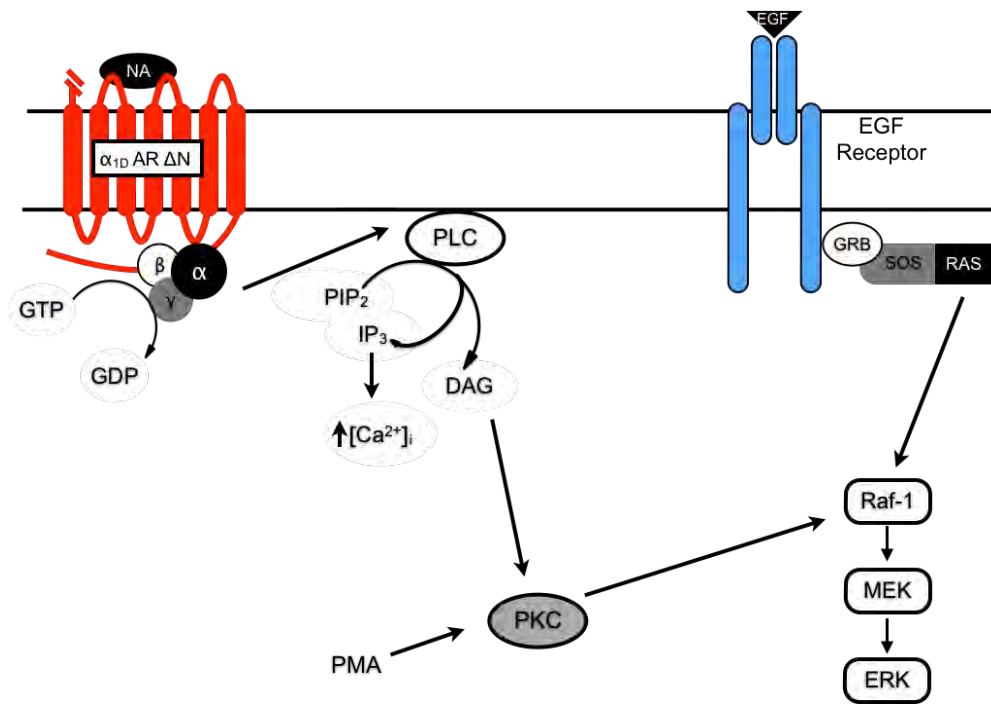


Figura 42. Modelo de acción de la noradrenalina y el factor de crecimiento epidérmico en la activación de la vía de ERK. NA, noradrenalina; α_{1D} -AR ΔN , receptor truncado en el amino; EGF, factor de crecimiento epidérmico; α, β, γ , subunidades de la proteína G, PLC fosfolipasa C; PIP_2 , fosfatidilinositol 4.5 bis-fosfato; IP_3 , inositol 1, 4, 5 tris-fosfato; PKC, proteína cinasa C.

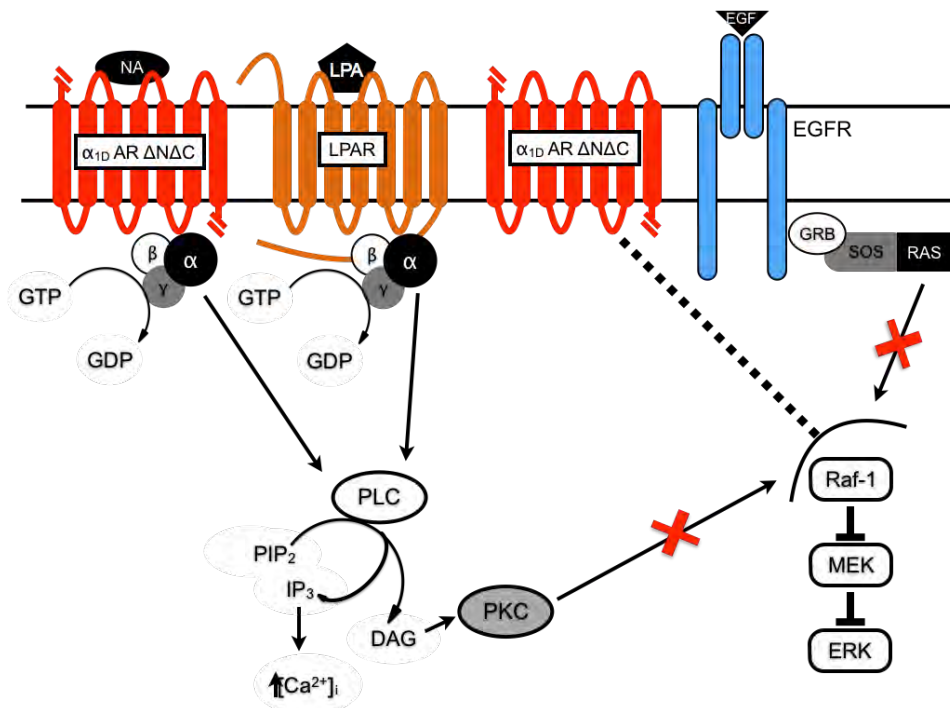


Figura 43. Mecanismo de la mutante con actividad de dominante negativa de la vía de ERK (α_{1D} -AR $\Delta N\Delta C$). NA, noradrenalina; α_{1D} -AR ΔN , receptor truncado en el amino; α_{1D} -AR $\Delta N\Delta C$, receptor truncado en el amino y el carboxilo, EGF, factor de crecimiento epidérmico; α, β, γ , subunidades de la proteína G, PLC fosfolipasa C; PIP_2 , fosfatidilinositol 4.5 bis-fosfato; IP_3 , inositol 1, 4, 5 tris-fosfato; PKC, proteína cinasa C; LPAR, receptor de ácido de lisofosfatídico.

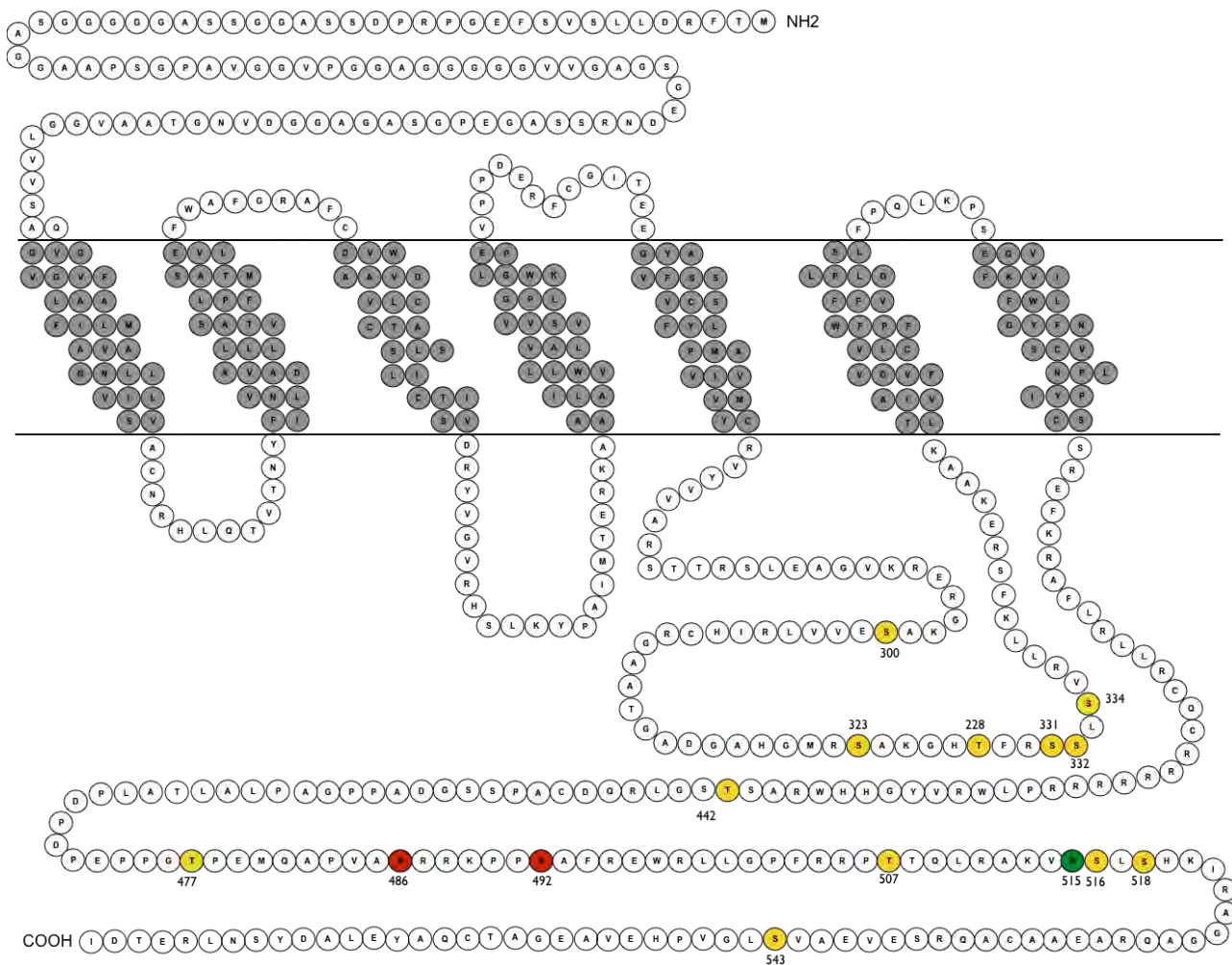


Figura 44. Los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR. Se muestran un esquema en 2D del α_{1D} -AR. En colores se indican los sitios de fosforilación identificados en este trabajo. En verde los sitios que se fosforilan por NA exclusivamente, en rojo los de fosforilación por PMA, en amarillo por ambos estímulos. Se indica el número de residuo.

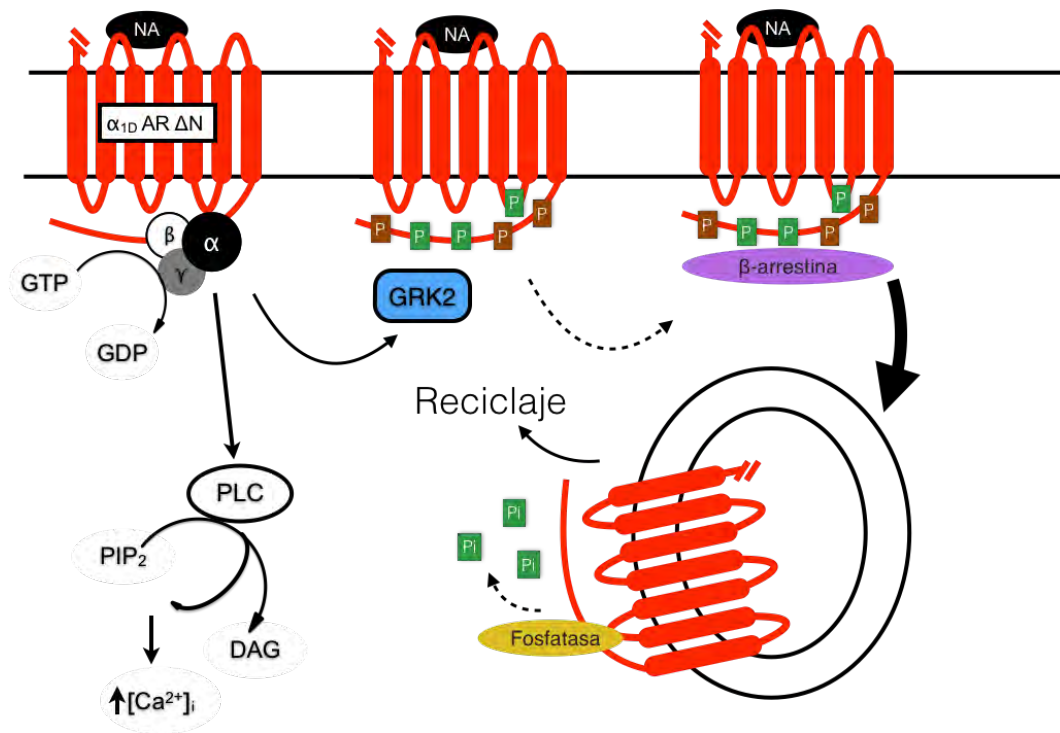


Figura 45. Modelo de la desensibilización homóloga del α_{1D} -AR. NA, noradrenalina; α_{1D} -AR Δ N, receptor truncado en el amino; EGF, GRK2, cinasa de GPCRs 2; α, β, γ , subunidades de la proteína G, PLC fosfolipasa C; PIP_2 , fosfatidilinositol 4.5 bis-fosfato; inositol 1, 4, 5 tris-fosfato. Se indican sitios de fosforilación en la tercera asa intracelular y la región carboxilo del receptor.

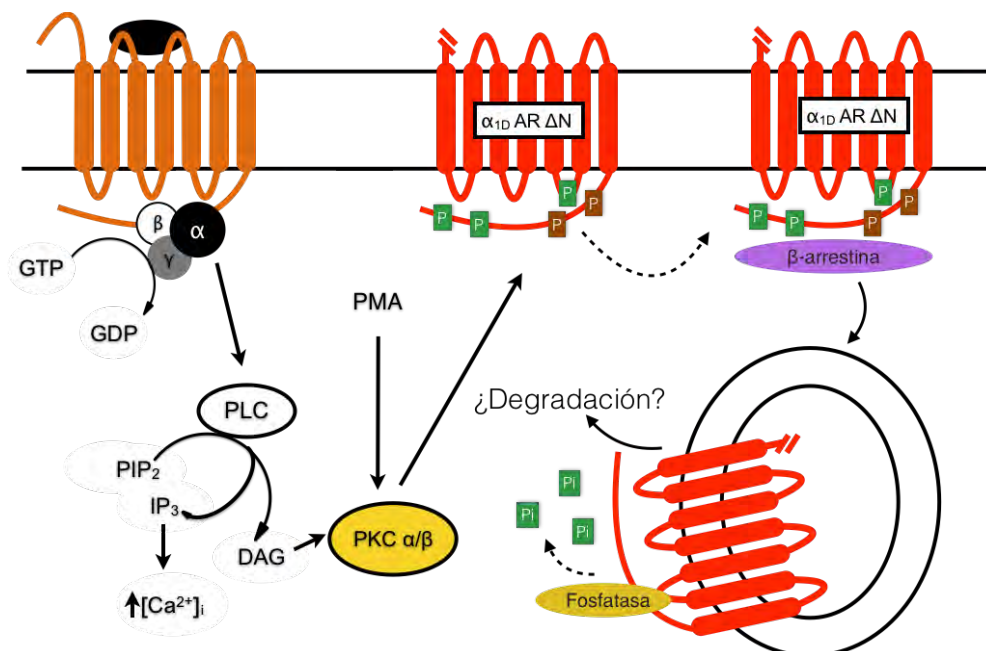


Figura 46. Modelo de la desensibilización heteróloga del α_{1D} -AR. NA, noradrenalina; PMA, forbol miristato acetato, PKC, proteína cinasa C; α_{1D} -AR Δ N, receptor truncado en el amino; EGF, GRK cinasa de GPCRs 2; α, β, γ , subunidades de la proteína G, PLC fosfolipasa C; PIP_2 , fosfatidilinositol 4.5 bis-fosfato; inositol 1, 4, 5 tris-fosfato. Se indican sitios de fosforilación en la tercera asa intracelular y la región carboxilo del receptor.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, E. F., Symowski, H., Buchfelder, M., & Poyner, D. R. (2000). A polymorphism in the growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) receptor gene is associated with elevated response to GHRH by human pituitary somatotrophinomas in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(1), 33–36. <https://doi.org/10.1006/bbr>
- Alfonso-Garrido, J., Garcia-Calvo, E., & Luque-Garcia, J. L. (2015). Sample preparation strategies for improving the identification of membrane proteins by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(17), 4893–4905. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8732-0>
- Alfonzo-Méndez, M. A., Alcántara-hernández, R., & García-sáinz, J. A. (2017). Novel Structural Approaches to Study GPCR Regulation, *International Journal of Molecular Sciences*. 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms18010027>
- Alfonzo-Méndez, M. A., Hernández-Espinosa, D. A., Carmona-Rosas G., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz G., & García-Sáinz, J. A. (2016). Protein kinase C activation promotes α_{1B} -adrenoceptor internalization and late endosome trafficking through Rab9 interaction. Role in heterologous desensitization. *Molecular Pharmacology* 2017 Jan 12. pii: mol.116.106583. doi: 10.1124/mol.116.106583
- Alfonzo-Méndez, M. A., Castillo-Badillo, J. A., Romero-Ávila, M. T., Rivera, R., Chun, J., & García-Sáinz, J. A. (2016). Carboxyl terminus-truncated α_{1D} -adrenoceptors inhibit the ERK pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 389(8), 911–920. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1254-2>
- Avendaño-Vázquez, S. E., García-Caballero, A., & García-Sáinz, J. A. (2005). Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1. *The Biochemical Journal*, 385(Pt 3), 677–84. <https://doi.org/10.1042/BJ20040891>
- Barquinero, J., Eixarch, H., & Pérez-Melgosa, M. (2004). Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Therapy*, 11 Suppl 1, S3–S9. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302363>
- Biology, C., & Ramos, J. W. (2008). The International Journal of Biochemistry The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells, 40, 2707–2719. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.04.009>
- Bortolato, A., Doré, A. S., Hollenstein, K., Tehan, B. G., Mason, J. S., & Marshall, F. H. (2014). Structure of Class B GPCRs: New horizons for drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3132–3145. <https://doi.org/10.1111/bph.12689>
- Bray, L., Froment, C., Pardo, P., Candotto, C., Burlet-Schiltz, O., Zajac, J. M., ... Moulédous, L. (2014). Identification and functional characterization of the phosphorylation sites of the neuropeptide FF2 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 33754–33766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612614>
- Bridson, S. J., Kellam, B., & Hill, S. J. (2011). Receptor Signal Transduction Protocols. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 746, 211–236. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-126-0>
- Busillo, J. M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., & Benovic, J. L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7805–7817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091173>
- Butcher, A. J., Hudson, B. D., Shimpukade, B., Alvarez-Curto, E., Prihandoko, R., Ulven, T., ... Tobin, A. B. (2014). Concomitant action of structural elements and receptor phosphorylation determines arrestin-3 interaction with the free fatty acid receptor FFA4. *Journal of Biological Chemistry*, 289(26), 18451–18465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.568816>
- Butcher, A. J., Prihandoko, R., Kong, K. C., McWilliams, P., Edwards, J. M., Bottrill, A., ... Tobin, A. B. (2011). Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11506–11518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154526>
- Casar, B., & Crespo, P. (2016). ERK Signals : Scaffolding Scaffolds ?, 4(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00049>

- Castillo-badillo, J. A., Molina-muñoz, T., Romero-ávila, M. T., Vázquez-macías, A., Rivera, R., Chun, J., & García-sáinz, J. A. (2012). Biochimica et Biophysica Acta Sphingosine 1-phosphate-mediated α 1B - adrenoceptor desensitization and phosphorylation . Direct and paracrine / autocrine actions. *BBA - Molecular Cell Research*, 1823(2), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.002>
- Castillo-Badillo, J. A., Sánchez-Reyes, O. B., Alfonzo-Méndez, M. A., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. (2015). α 1B-Adrenergic receptors differentially associate with rab proteins during homologous and heterologous desensitization. *PLoS ONE*, 10(3), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121165>
- Cbs, D. (2000). α 1 -Adrenoceptors: function and phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*.
- Chalothorn, D., McCune, D. F., Edelman, S. E., García-Cazarín, M. L., Tsujimoto, G., & Piascik, M. T. (2002). Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the α (1)-adrenoceptor subtypes. *Molecular Pharmacology*, 61(5), 1008–16. <https://doi.org/10.1124/mol.61.5.1008>
- Chen, C., Chiu, Y.-T., Wu, W., Huang, P., Mann, A., Schulz, S., & Liu-Chen, L.-Y. (2016). Determination of sites of U50,488H-promoted phosphorylation of the mouse κ opioid receptor (KOPR): Disconnect between KOPR phosphorylation and internalization. *Biochemical Journal*, 473(4), 497–508. <https://doi.org/10.1042/BJ20141471>
- Chen, X., Bai, B., Tian, Y., Du, H., & Chen, J. (2014). Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31173–31187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574020>
- Chen, Z. J., & Minneman, K. P. (2005). Recent progress in α 1-adrenergic receptor research. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(11), 1281–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00224.x>
- Chen, Z., Hague, C., Hall, R. A., & Minneman, K. P. (2006). Syntrophins regulate α 1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12414–12420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508651200>
- Constantin, B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(2), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.023>
- Corvera, S., Schwarz, K. R., Graham, R. M., & Garcia-Sainz, J. A. (1986). Phorbol esters inhibit α 1-adrenergic effects and decrease the affinity of liver cell α 1-adrenergic receptors for (-)-epinephrine. *Journal of Biological Chemistry*, 261(2), 520–526.
- Cotecchia, S., Scheer, A., Diviani, D., Fanelli, F., & De Benedetti, P. G. (1998). Molecular mechanisms involved in the activation and regulation of the α 1-adrenergic receptor subtypes. *Farmaco (Società Chimica Italiana: 1989)*, 53(4), 273–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9658585>
- Cotecchia, S. (2007). Constitutive activity and inverse agonism at the α 1adrenoceptors. *Biochemical Pharmacology*, 73(8), 1076–1083. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.10.024>
- Covic, L., Gresser, A. L., Talavera, J., Swift, S., & Kuliopulos, A. (2002). Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 643–648. <https://doi.org/10.1073/pnas.022460899>
- Dhanasekaran, D. N., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H., & Reddy, E. P. (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules, 3185–3202. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210411>
- Diviani, D., Lattion, A., & Cotecchia, S. (1997). Characterization of the Phosphorylation Sites Involved in G Protein-coupled Receptor Kinase- and Protein Kinase C-mediated Desensitization of the α 1B -Adrenergic Receptor *, 272(45), 28712–28719.
- Docherty, J. R. (2010). Subtypes of functional α 1-adrenoceptor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 405–417. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0174-4>
- Doré, A. S., Okrasa, K., Patel, J. C., Serrano-Vega, M., Bennett, K., Cooke, R. M., ... Marshall, F. H. (2014). Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature*, 511(7511), 557–62. <https://doi.org/10.1038/nature13396>
- Dores, M. R., & Trejo, J. (2012). Ubiquitination of G protein-coupled receptors: functional implications and drug discovery. *Molecular Pharmacology*, 82(4), 563–70. <https://doi.org/10.1124/mol.112.079418>

- Ferguson, S. S. G. (2007). Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(4), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.008>
- Fredriksson, R., & Schio, H. B. (2005). The Repertoire of G-Protein – Coupled Receptors in Fully. *Molecular Pharmacology*, 67(5), 1414–1425. <https://doi.org/10.1124/mol.104.009001.sequenced>
- Gao, S., Malbon, C., & Wang, H.-Y. (2014). Probing the stoichiometry of β 2-adrenergic receptor phosphorylation by targeted mass spectrometry. *Journal of Molecular Signaling*, 9(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-9-3>
- García-Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J., & Villalobos-Molina, R. (1999). α 1-Adrenoceptors: Subtypes, Signaling, and Roles in Health and Disease. *Archives of Medical Research*, 30(6), 449–458. [https://doi.org/10.1016/S0188-0128\(99\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0188-0128(99)00059-7)
- García-Sáinz, J. A., Mendoza-Mendoza, A., & Vázquez-Prado, J. (1999). Intracellular calcium and α 1B-adrenoceptor phosphorylation. *Archives of Medical Research*, 30(5), 353–357. [https://doi.org/10.1016/S0188-0128\(99\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0188-0128(99)00043-3)
- García-Sáinz, J. A., Rodríguez-Pérez, C. E., & Romero-Ávila, M. T. (2004). Human α 1D-adrenoceptor phosphorylation and desensitization. *Biochemical Pharmacology*, 67(10), 1853–1858. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.01.025>
- García-Sáinz, J. A., Romero-Ávila, M. T., & Medina, L. del C. (2010). α 1D-Adrenergic Receptors, 484(10), 109–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381298-8.00006-X>
- García-Sáinz, J. A., Romero-Ávila, M. T., & Alcántara-Hernández, R. (2011). Mechanisms involved in α 1B-adrenoceptor desensitization. *IUBMB Life*, 63(10), 811–815. <https://doi.org/10.1002/iub.519>
- García-Sáinz, J. A., & Torres-Padilla, M. E. (1999). Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing α (1d)-adrenoceptors. *FEBS Letters*, 443(3), 277–281. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01738-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01738-4)
- García-Sáinz, J. A., & Villalobos-Molina, R. (2004). The elusive α 1D-adrenoceptor: Molecular and cellular characteristics and integrative roles. *European Journal of Pharmacology*, 500(1–3 SPEC. ISS.), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.016>
- García-Sáinz, J. A., Vázquez-Cuevas, F. G., & Romero-Ávila, M. T. (2001). Phosphorylation and desensitization of α 1d-adrenergic receptors. *Biochemical Journal*, 353(3), 603–610. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3530603>
- Gavi, S., Shumay, E., Wang, H. Y., & Malbon, C. C. (2006). G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 17(2), 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.01.006>
- Gisbert, R., Noguera, M. a, Ivorra, M. D., & D’Ocon, P. (2000). Functional evidence of a constitutively active population of α (1D)-adrenoceptors in rat aorta. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(2), 810–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046122>
- Gisbert, R., Ziani, K., Miquel, R., Noguera, M. A., Ivorra, M. D., Anselmi, E., & D’Ocon, P. (2002). Pathological role of a constitutively active population of α (1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol.*, 135(1), 206–216.
- Graham, M. (n.d.). of Expressed Multiple Signaling Specific Receptors to Pathways Is Both G Protein and Cell Type, 784–795.
- Groat, B. Y. W. C. D. E., & Saum, W. R. (1972). of Pharmacology, (1990), 297–314.
- Gurevich, E. V., Tesmer, J. J. G., Mushegian, A., & Gurevich, V. V. (2012). G protein-coupled receptor kinases: More than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacology and Therapeutics*, 133(1), 40–69. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.08.001>
- Hague, C., Chen, Z., Pupo, A. S., Schulte, N. a, Toews, M. L., & Minneman, K. P. (2004). The N Terminus of the Human α 1D -Adrenergic Receptor Prevents Cell Surface Expression, 309(1), 388–397. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060509.genic>

- Hague, C., Lee, S. E., Chen, Z., Prinster, S. C., Hall, R. a., & Minneman, K. P. (2006). Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity. *Molecular Pharmacology*, 69(1), 45–55. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014985>
- Harvey, C. D., Ehrhardt, A. G., Cellurale, C., Zhong, H., Yasuda, R., Davis, R. J., & Svoboda, K. (2008). A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49), 19264–19269. <https://doi.org/0804598105> [pii]r10.1073/pnas.0804598105
- Hassell, A. M., An, G., Bledsoe, R. K., Bynum, J. M., Carter, H. L., Deng, S. J. J., ... Shewchuk, L. M. (2006). Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63(1), 72–79. <https://doi.org/10.1107/S0907444906047020>
- Hollenstein, K., De Graaf, C., Bortolato, A., Wang, M. W., Marshall, F. H., & Stevens, R. C. (2014). Insights into the structure of class B GPCRs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.11.001>
- Huang, R. Y.-C., & Chen, G. (2014). Higher order structure characterization of protein therapeutics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 6541–6558. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7924-3>
- Jacobson, K. A. (2015). New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochemical Pharmacology*, 98(4), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.085>
- Jeong, J., Park, Y. U., Kim, D. K., Lee, S., Kwak, Y., Lee, S. A., ... Park, S. K. (2013). Cdk5 phosphorylates dopamine D2 receptor and attenuates downstream signaling. *PLoS ONE*, 8(12), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084482>
- Kaltashov, I. A., & Eyles, S. J. (2002). Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 21(1), 37–71. <https://doi.org/10.1002/mas.10017>
- Kim, S., Jeon, T.-J., Oberai, A., Yang, D., Schmidt, J. J., & Bowie, J. U. (2005). Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14278–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501234102>
- Kobilka, B. (2013). The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (nobel lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(25), 6380–6388. <https://doi.org/10.1002/anie.201302116>
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351 Pt 2, 289–305. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3510289>
- Kountz, T. S., Lee, K.-S., Aggarwal-Howarth, S., Curran, E., Park, J.-M., Harris, D.-A., ... Hague, C. (2016). Endogenous N-terminal Domain Cleavage Modulates α 1D-Adrenergic Receptor Pharmacodynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 291(35), 18210–18221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.729517>
- Lagerstrom, M. C., & Schioth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 7(4), 339–357. <https://doi.org/10.1038/nrd2518>
- Langer, I., Langlet, C., & Robberecht, P. (2005). Effect of inactivating mutations on phosphorylation and internalization of the human VPAC2 receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(2), 405–414. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01717>
- Lee, J.-J., Park, Y. S., & Lee, K.-J. (2015). Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry for determining protein structural changes in drug discovery. *Archives of Pharmacal Research*, 1737–1745. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0584-9>
- Lee, K. A., Craven, K. B., Niemi, G. A., & Hurley, J. B. (2002). Mass spectrometric analysis of the kinetics of in vivo rhodopsin phosphorylation. *Protein Sci*, 11(4), 862–874. <https://doi.org/10.1110/ps.3870102>
- Lefkowitz, R. J. (2011). R EVIEW Transduction of Receptor Signals. *Science*, 512(2005), 512–518. <https://doi.org/10.1126/science.1109237>
- Lefkowitz, R. J. (2013). A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(25), 6366–6378. <https://doi.org/10.1002/anie.201301924>
- Levchenko, A., Bruck, J., & Sternberg, P. W. (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties.

- Liu, P. T., Ta, V., & Villa, H. (2001). High-Yield Expression and Purification of Human Interferon γ -1 in *Pichia pastoris*. 387, 381–387. <https://doi.org/10.1006/pr>
- Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (1991). Molecular biology of alpha-adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1095(2), 127–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1657194>
- Lomasney, J. W., Lorenz, W., Allen, L. F., King, K., Regan, J. W., Yang-Feng, T. L., ... Lefkowitz, R. J. (1990). Expansion of the alpha 2-adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human alpha 2-adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 87(13), 5094–5098.
- Lundin, L., Oth, H. B. S., & Breeding, A. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families . Phylogenetic Analysis , Paralagon Groups , and Fingerprints, 63(6), 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>
- Luttrell, L. M., & Gesty-Palmer, D. (2010). Beyond Desensitization : Physiological Relevance of Arrestin - Dependent Signaling. *Pharmacological Reviews*, 62(2), 305–330. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002436.nated>
- Lyssand, J. S., Whiting, J. L., Lee, K., Kastl, R., Wacker, J. L., Bruchas, M. R., ... Adams, M. E. (2010). Adrenergic Receptor / Dystrophin-Associated Protein Complex Signalosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010819107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010819107>
- Lyssand, J. S., Lee, K. S., DeFino, M., Adams, M. E., & Hague, C. (2011). Syntrophin isoforms play specific functional roles in the ?? 1D-adrenergic receptor/DAPC signalosome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(4), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.004>
- Maeda, T., Imanishi, Y., & Palczewski, K. (2003). Rhodopsin phosphorylation: 30 Years later. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22(4), 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(03\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(03)00017-X)
- Marchese, A., Paing, M. M., Temple, B. R. S., & Trejo, J. (2008). G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 601–629. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094646>
- Maroni, P. D., Koul, S., Meacham, R. B., & Koul, H. K. (2004). Mitogen Activated Protein kinase signal transduction pathways in the prostate. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-2-5>
- McCune, D. F., Edelmann, S. E., Olges, J. R., Post, G. R., Waldrop, B. a, Waugh, D. J., ... Piascik, M. T. (2000). Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Molecular Pharmacology*, 57(4), 659–666.
- McCusker, E. C., Bane, S. E., O'Malley, M. A., & Robinson, A. S. (2007). Heterologous GPCR expression: A bottleneck to obtaining crystal structures. *Biotechnology Progress*, 23(3), 540–547. <https://doi.org/10.1021/bp060349b>
- McDonald, P. H., Chow, C.-W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F.-T., ... Lefkowitz, R. J. (2000). β -Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3. *Science*, 290(5496), 1574–1577. <https://doi.org/10.1126/science.290.5496.1574>
- Mech, L. D. (2014). A Gray Wolf (*Canis lupus*) Delivers Live Prey to a Pup. *Canadian Field-Naturalist*, 128(2), 189–190. <https://doi.org/10.1016/j>
- Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Leung, E., ... Borea, P. A. (2006). Modulation of the Akt/Ras/Raf/MEK/ERK pathway by A3 adenosine receptor. *Purinergic Signalling*, 2(4), 627–632. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9020-4>
- Mishima, K., Tanoue, A., Tsuda, M., Hasebe, N., Fukue, Y., Egashira, N., ... Fujiwara, M. (2004). Characteristics of behavioral abnormalities in ??1d- adrenoceptors deficient mice. *Behavioural Brain Research*, 152(2), 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.038>

- Moulédous, L., Froment, C., Burlet-Schiltz, O., Schulz, S., & Mollereau, C. (2015). Phosphoproteomic analysis of the mouse brain mu-opioid (MOP) receptor. *FEBS Letters*, 589(18), 2401–2408. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.025>
- Mustafi, D., & Palczewski, K. (2009). Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Molecular Pharmacology*, 75(1), 1–12. <https://doi.org/10.1124/mol.108.051938>
- Na, S., Jeong, J., Park, H., Lee, K.-J., & Paek, E. (2008). Unrestrictive identification of multiple post-translational modifications from tandem mass spectrometry using an error-tolerant algorithm based on an extended sequence tag approach. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 7(12), 2452–2463. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800101-MCP200>
- Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., ... Lefkowitz, R. J. (2011). Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Science Signaling*, 4(185), ra51. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001707>
- Nørskov-Lauritsen, L., & Bräuner-Osborne, H. (2015). Role of post-translational modifications on structure, function and pharmacology of class C G protein-coupled receptors. *European Journal of Pharmacology*, 763, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.015>
- Pagel, O., Lorocho, S., Sickmann, A., & Zahedi, R. P. (2015). Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 12(3), 235–53. <https://doi.org/10.1586/14789450.2015.1042867>
- Pdf, T. P., & Pharmacology, B. M. C. (2009). BMC Pharmacology. *BMC Pharmacology*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-8-13>
- Perez-Aso, M., Segura, V., Montó, F., Baretino, D., Noguera, M. A., Milligan, G., & D'Ocon, P. (2013). The three $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(10), 2322–2333. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.013>
- Perez, D. M., Piascik, M. T., & Graham, R. M. (1991). Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. *Molecular Pharmacology*, 40(6), 876–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1661838>
- Pitcher, J. A., Freedman, N. J., & Lefkowitz, R. J. (1998). G Protein – Coupled Receptor Kinases, 1–15.
- Porter, J. E., Hwa, J., & Perez, D. M. (1996). Activation of the $\beta(1b)$ -adrenergic receptor is initiated by disruption of an interhelical salt bridge constraint. *Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28318–28323. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28318>
- Pupo, A. S., Uberti, M. A., & Minneman, K. P. (2003). N-terminal truncation of human $\beta 1D$ -adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein. *European Journal of Pharmacology*, 462(1–3), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01292-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01292-5)
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., & Lefkowitz, R. J. (2010). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(5), 373–86. <https://doi.org/10.1038/nrd3024>
- Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., ... Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the $\beta 2$ adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366), 549–55. <https://doi.org/10.1038/nature10361>
- Receptors, G. P., Lefkowitz, R. J., & Carolina, N. (n.d.). Minireview, 18677–18681.
- Rials, M., & Ods, M. E. T. H. (1996). The β -Adrenergic Receptor Is a Substrate for the Insulin Receptor Tyrosine Kinase, 271(2), 1061–1064.
- Rodríguez-Pérez, C. E., Calvo-Ochoa, E., Kalashnikova, E. V., Reyes-Cruz, G., Romero-Ávila, M. T., & García-Sáinz, J. A. (2009)a. Receptor tyrosine kinases regulate $\alpha 1D$ -adrenoceptor signaling properties: Phosphorylation and desensitization. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(6), 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.10.030>
- Rodríguez-Pérez, C. E., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. (2009b). Signaling properties of human $\alpha 1D$ -adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: Intrinsic activity, agonist-mediated

activation, and desensitization. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 380(2), 99–107. <https://doi.org/10.1007/s00210-009-0428-6>

- Rokosh, D. G., Bailey, B. a, Stewart, a F., Karns, L. R., Long, C. S., & Simpson, P. C. (1994). Distribution of alpha 1C-adrenergic receptor mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with alpha 1B and alpha 1D. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1575>
- Rosa, M., Bech-Serra, J. J., Canals, F., Zajac, J. M., Talmont, F., Arsequell, G., & Valencia, G. (2015). Optimized Proteomic Mass Spectrometry Characterization of Recombinant Human μ -Opioid Receptor Functionally Expressed in *Pichia pastoris* Cell Lines. *Journal of Proteome Research*, 14(8), 3162–3173. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00104>
- Sánchez-reyes, O. B., Romero-ávila, M. T., Castillo-badillo, J. A., Takei, Y., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., ... García-sáinz, J. A. (2014). Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*, 723, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.003>
- Sardi, S. P., Murtie, J., Koirala, S., Patten, B. A., & Corfas, G. (2006). Presenilin-Dependent ErbB4 Nuclear Signaling Regulates the Timing of Astrogenesis in the Developing Brain. *Cell*, 127(1), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.037>
- Schwinn, D. A., Johnston, G. I., Page, S. O., Mosley, M. J., Wilson, K. H., Worman, N. P., ... Parry-Smith, D. J. (1995). Cloning and pharmacological characterization of human alpha-1 adrenergic receptors: sequence corrections and direct comparison with other species homologues. *J Pharmacol Exp Ther*, 272(1), 134–142. Retrieved from <http://jpet.aspetjournals.org/content/272/1/134.abstract>
- Shaw, P. E., & Saxton, J. (2003). Ternary complex factors: Prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(8), 1210–1226. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00031-1)
- Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2011). μ -Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(9), 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.002>
- Shukla, A. K., Manglik, A., Kruse, A. C., Xiao, K., Reis, R. I., Tseng, W.-C., ... Lefkowitz, R. J. (2013). Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*, 497(7447), 137–141. <https://doi.org/10.1038/nature12120>
- Slupsky, J. R., Qwitterer, U., Weber, C. K., Gierschik, P., Lohse, M. J., & Rapp, U. R. (1999). Binding of Gbg subunits to cRaf1 downregulates G-protein-coupled receptor signalling. *Current Biology*, 9(August), 971–974.
- Sosa-alvarado, C., Hernández-méndez, A., Romero-ávila, M. T., Sánchez-reyes, O. B., Takei, Y., Tsujimoto, G., ... García-sáinz, J. A. (2015). Agonists and protein kinase C-activation induce phosphorylation and internalization of FFA1 receptors. *European Journal of Pharmacology*, 768, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.038>
- Stanasila, L., Abuin, L., Dey, J., & Cotecchia, S. (2008). Different Internalization Properties of the α 1a- and α 1b- Adrenergic Receptor Subtypes : The Potential Role of Receptor Interaction with μ -Arrestins and AP50 \square , 562–573. <https://doi.org/10.1124/mol.107.043422>.
- Tanoue, A., Koba, M., Miyawaki, S., Koshimizu, T. A., Hosoda, C., Oshikawa, S., & Tsujimoto, G. (2002). Role of the α 1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension*, 40(1), 101–106. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000022062.70639.1C>
- Tanoue, A., Koshimizu, T., & Tsujimoto, G. (2002). Transgenic studies of alpha(1)-adrenergic receptor subtype function. *Life Sciences*, 71(19), 2207–15. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02012-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02012-X)
- Tanoue, A., Nasa, Y., Koshimizu, T., Shinoura, H., Oshikawa, S., Kawai, T., ... Takeo, S. (2002). The α 1D - adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction, 109(6), 765–775. <https://doi.org/10.1172/JCI200214001.Introduction>
- Thal, D. M., Homan, K. T., Chen, J., Wu, E. K., Hinkle, P. M., Huang, Z. M., ... Tesmer, J. J. G. (2012). Paroxetine is a direct inhibitor of G protein-coupled receptor kinase 2 and increases myocardial contractility. *ACS Chemical Biology*, 7(11), 1830–1839. <https://doi.org/10.1021/cb3003013>

- Thomsen, A. R. B., Plouffe, B., Cahill, T. J., Shukla, A. K., Tarrasch, J. T., Dosey, A. M., ... Lefkowitz, R. J. (2016). GPCR-G Protein- $\beta\gamma$ -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell*, 166(4), 907–919. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004>
- Tobin, A. B. (2008). G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl(August 2007), S167-76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707662>
- Tobin, A. B., Butcher, A. J., & Kong, K. C. (2008). Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(8), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.006>
- Torrecilla, I., Spragg, E. J., Poulin, B., McWilliams, P. J., Mistry, S. C., Blaukat, A., & Tobin, A. B. (2007). Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *Journal of Cell Biology*, 177(1), 127–137. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610018>
- Trester-zedlitz, M., Burlingame, A., Kobilka, B., & Zastrow, M. Von. (2005). Mass Spectrometric Analysis of Agonist Effects on Posttranslational Modifications of the α_2 Adrenoceptor in Mammalian Cells †, 6133–6143.
- Vázquez-Prado, J., & García-Sáinz, J. A. (1996). Effect of phorbol myristate acetate on α_1 -adrenergic action in cells expressing recombinant α_1 -adrenoceptor subtypes. *Molecular Pharmacology*, 50(1), 17–22.
- Venkatakrishnan, a J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of. *Nature*, 494(7436), 185–194. <https://doi.org/10.1038/nature11896>
- Villalobos-Molina, R., Lopez-Guerrero, J. J., & Ibarra, M. (1999). Functional evidence of alpha1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 126(7), 1534–1536. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702468> [doi]
- Villalobos-Molina, R., & Ibarra, M. (1996). β_1 -Adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the β_1D or β_1A subtypes. *European Journal of Pharmacology*, 298(3), 257–263. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00781-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00781-4)
- Waldrop, B. A., Mastalerz, D., Piascik, M. T., & Post, G. R. (2002). alpha(1B)- and alpha(1D)-Adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat 1 fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(1), 83–90. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.1.83>
- Wang, X., Zeng, W., Soyombo, A. A., Tang, W., Ross, E. M., Barnes, A. P., ... Muallem, S. (2005). Spinophilin regulates Ca²⁺ signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors. *Nature Cell Biology*, 7(4), 405–411. <https://doi.org/10.1038/ncb1237>
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol Rev*, 79(1), 143–180. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.28.16586>
- Wright, C. D., Chen, Q., Baye, N. L., Huang, Y., Healy, C. L., Kasinathan, S., & O'Connell, T. D. (2008). Nuclear α_1 -adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes. *Circulation Research*, 103(9), 992–1000. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176024>
- Wu-Zhang, A. X., & Newton, A. C. (2013). Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. *Biochemical Journal*, 452(2), 195–209. <https://doi.org/10.1042/bj20130220>
- Xin, F., & Radivojac, P. (2012). Post-translational modifications induce significant yet not extreme changes to protein structure. *Bioinformatics*, 28(22), 2905–2913. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts541>
- Xu, Z., Hirasawa, A., Shinoura, H., & Tsujimoto, G. (1999). Interaction of the α_1B -adrenergic receptor with gC1q-R, a multifunctional protein. *J.Biol.Chem.*, 274(30), 21149–21154.
- Yang, X., Zheng, J., Xiong, Y., Shen, H., Sun, L., Huang, Y., ... He, J. (2010). Beta-2 adrenergic receptor mediated ERK activation is regulated by interaction with MAGI-3. *FEBS Letters*, 584(11), 2207–2212. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.039>
- Zhang, T., Xu, Q., Chen, F., Han, Q., & Zhang, Y. (2004). Yeast two-hybrid screening for proteins that interact with alpha1-adrenergic receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(11), 1471–1478.

ZIndel, D., Engel, S., Bottrill, A. R., Pin, J.-P., Prezeau, L., Tobin, A. B., ... Butcher, A. J. (2016). Identification of key phosphorylation sites in PTH1R which determine arrestin3 binding and fine tune receptor signaling. *Biochemical Journal*, 0, 4173–4192. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160740>

12. ANEXOS

12.1 Anexo I: Plásmidos generados durante el trabajo de tesis.

Plásmido	Descripción	Sitios de clonación	Resistencia
pΔN-GFP	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP	<i>NheI/EcoRI</i>	Kanamicina
pΔNΔC-GFP	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP	<i>NheI/EcoRI</i>	Kanamicina
pΔNΔC-3ΔL	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A en la tercera asa	<i>NheI/EcoRI</i>	Kanamicina
pΔN-GFP-Trex	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP. Sist. T-rex	<i>HindIII/NotI</i>	Ampicilina
pΔNΔC-GFP-Trex	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP Sist. T-rex	<i>HindIII/NotI</i>	Ampicilina
pΔN-3ΔL-GFP-Trex	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP con S300/323/331/332/334A/T328V en la tercera asa. Sist. T-rex	<i>HindIII/NotI</i>	Ampicilina
pΔNΔC-3ΔL-GFP-Trex	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP con S300/323/331/332/334A/T328V en la tercera asa. Sist. T-rex	<i>HindIII/NotI</i>	Ampicilina
pΔNΔC-3ΔL-2-Trex	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A en la tercera asa. Sist. T-rex	<i>HindIII/NotI</i>	Ampicilina
pIL3WT-GFP	Fusión de la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} : (276-348)-GFP	<i>EcoRI/BamHI</i>	Kanamicina
pIL3S/A-GFP	Fusión de la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} : (276-348)-GFP con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A	<i>EcoRI/BamHI</i>	Kanamicina
pIL3S/D-GFP	Tercera asa intracelular del receptor α_{1D} : (276-348)-GFP con S283D, S287D, S300D, S323D, S331D, S332D, S334D, S341D	<i>EcoRI/BamHI</i>	Kanamicina
pIL3WT-GST	Tercera asa intracelular del receptor α_{1D} : (276-348)-GST	<i>EcoRI/BamHI</i>	Ampicilina
pIL3S/A-GST	Fusión de la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} : (276-348)-GST con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A	<i>EcoRI/BamHI</i>	Ampicilina
pIL3S/D-GST	Tercera asa intracelular del receptor α_{1D} : (276-348)-GFP con S283D, S287D, S300D, S323D, S331D, S332D, S334D, S341D	<i>EcoRI/BamHI</i>	Ampicilina
pΔN-GFP-S001	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP. Sist. Lentivirus	<i>BamHI/EcoRI</i>	Ampicilina
pΔNΔC-GFP-S001	Fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP. Sist. Lentivirus	<i>BamHI/EcoRI</i>	Ampicilina

Plásmido	Descripción	Sitios de clonación	Resistencia
pΔN-3ΔL-GFP-S001	Fusión del receptor α_{1D} Δ1-79-GFP con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A en la tercera asa. Sist. Lentivirus	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	Ampicilina
pΔNΔC-3ΔL-GFP-S001	Fusión del receptor α_{1D} Δ1-79 Δ5440-572-GFP con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A en la tercera asa. Sist. Lentivirus	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	Ampicilina
pIL3WT-S001	Fusión de la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} : (276-348)-GFP. Sist. Lentivirus	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	Ampicilina
pΔN-IRES-GFP-S001	Receptor α_{1D} Δ1-79 GFP soluble. Sist. Lentivirus	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	Ampicilina
pΔNΔC-GFP-IRES-S001	Receptor α_{1D} Δ1-79 Δ5440-572 GFP soluble. Sist. T-rex	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	Ampicilina
pΔN-3ΔL-IRES-GFP-S001	Receptor α_{1D} Δ1-79 GFP soluble con S300/323/331/332/334A/T328V en la tercera asa. Sist. Lentivirus	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	Ampicilina
pΔNΔC-3ΔL-IRES-GFP-S001	Receptor α_{1D} Δ1-79 Δ5440-572 GFP soluble con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A en la tercera asa. Sist. Lentivirus	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	Ampicilina
pΔN-dsRed	Fusión del receptor α_{1D} Δ1-79-DsRed	<i>Nhe</i> I/ <i>Eco</i> RI	Kanamicina
pΔNΔC-dsRed	Fusión del receptor α_{1D} Δ1-79 Δ5440-572-DsRed	<i>Nhe</i> I/ <i>Eco</i> RI	Kanamicina

12.2 Anexo II: Líneas celulares generadas durante el trabajo de tesis.

Nombre	Línea celular	Descripción	Sistema
Δ N-GFP- B103	B103	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP	G418
Δ N Δ C-GFP-B103	B103	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP	G418
TN2B	HEK293	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP	T-Rex
TR5	HEK293	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP	T-Rex
Mut12	HEK293	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP con S300/323/331/332/334A/T328V en la tercera asa.	T-Rex
Mut22	HEK293	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP con S300/323/331/332/334A/T328V en la tercera asa.	T-Rex
M1	HEK293	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A en la tercera asa	T-Rex
Δ N-GFP-S001	B103	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP	Lentivirus
Δ N Δ C-GFP-S001	B103	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP	Lentivirus
Δ N-3 Δ L-GFP-S001	B103	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79-GFP con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A en la tercera asa	Lentivirus
Δ N Δ C-3 Δ L-GFP-S001	B103	Expresan fusión del receptor α_{1D} Δ 1-79 Δ 5440-572-GFP con S283A, S287A, S300A, S323A, S331A, S332A, S334A, S341A en la tercera asa.	Lentivirus
IL3WT-S001	B103	Expresan fusión de la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} : (276-348)-GFP.	Lentivirus

12.3 Anexo III: Secuencia primaria del α_{1D} -AR

>sp|P25100|ADA1D_HUMAN Alpha-1D adrenergic receptor OS=Homo sapiens GN=ADRA1D PE=1 SV=2

10	20	30	40	50
MTFRDLLSVS FEGPRPDSSA GGSSAGGGGG SAGGAAPSEG PAVGGVPGGA				
60	70	80	90	100
GGGGGVVGAG SGEDNRSSAG EPGSAGAGGD VNGTAAVGGL VVSAQGVGVG				
110	120	130	140	150
VFLAAFILMA	VAGNLLVILS	VACNRHLQTV	TNYFIVNLAV	ADLLLSATVL
160	170	180	190	200
PFSATMEVLG	FWAFGRAFCD	VWAAVDVLCC	TASILSLCTI	SVDRYVGVRRH
210	220	230	240	250
SLKYP AIMTE	RKAAAILALL	WVVALVVS VG	PLLGWKEPVP	PDERFCGITE
260	270	280	290	300
EAGYAVFSSV	CSFYLPMAVI	VVMYCRVYVV	ARSTTRSLEA	GVKREERGKAS
310	320	330	340	350
EVVLR IHCRG	AATGADGAHG	MRS AKGHTFR	SSL SVRLLKF	SREKKA AKTL
360	370	380	390	400
AIVVG VVFLC	WFPFFFVLPL	GSLFPQLKPS	EGVFKVIFWL	GYFN SCVNPL
410	420	430	440	450
IYPCS	SREFK	RAFLRLLRCQ	CRRRRRRRPL	WRVYGHHWRA
460	470	480	490	500
PSSGDAPPGA PLALTALPDP DPEPPGTPEM QAPVASRRKP PSAFREWRLI				
510	520	530	540	550
GPFRRPTTOL RAKVSSL SHK IRAGGAQRAE AAC AORSEVE AVSLGVPHEV				
560	570			
AEGATCOAYE LADYSNLRET DI				

*Región amino (NH₂)

*Regiones transmembranales

*Tercera asa Intracelular (IL3)

*Región Carboxilo (COOH)

*Las regiones truncadas se indican en **negritas y subrayadas**

12.4 Anexo IV: Perspectivas del proyecto *in extenso*

Durante este proyecto resolvimos algunas preguntas específicas relacionadas con la relación estructura/función del α_{1D} -AR y su papel durante la atenuación de las señales. Sin embargo, quedaron muchas preguntas por aclarar. El uso de herramientas bioinformáticas en combinación con técnicas de biología molecular, análisis por espectrometría de masas y la implementación del sistema de expresión T-rex ayudó a superar las limitaciones técnicas que habían detenido el avance del estudio del α_{1D} -AR. Por lo anterior, se abrió una gama de posibilidades para incrementar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan este receptor adrenérgico. Los proyectos que surgieron de la presente tesis se mencionan a continuación. Algunos se encuentran ya en etapas iniciales.

Papel de los grupos de sitios de fosforilación del α_{1D} -AR en su señalización.

En esta tesis identificamos los sitios de fosforilación del α_{1D} -AR localizados en la tercera asa intracelular y en la región carboxilo. No obstante, encontramos numerosos sitios de fosforilación en el receptor. Por lo anterior, atribuimos la señalización diferencial observada a los dominios intracelulares en los que identificamos los residuos fosforilables. Sin embargo, es posible realizar una caracterización más detallada de los sitios de fosforilación aquí reportados.

Por ejemplo, el grupo de Milligan describió recientemente que la señalización sesgada del receptor para ácidos grasos 4 (GPR120) es regulada por un grupo de residuos fosforilables cercanos entre sí y localizados en su región carboxilo (Prihandoko et al., 2016). Nosotros también detectamos dos grupos de residuos fosforilables próximos entre sí en la región carboxilo del α_{1D} -AR (Fig. 47). Hemos generado las mutantes que se muestran en la figura 47, así como las células que las expresan de manera inducible (sistema T-rex). Las construcciones consisten en la mutación de los dos grupos de fosforilación identificados, ya sea de manera individual o simultánea (marcadas en rojo). Pretendemos evaluar los perfiles de fosforilación, la liberación de calcio intracelular, la activación y migración de ERK y la internalización de las mutantes en respuesta a distintos estímulos. Otro objetivo es analizar la activación de vías de señalización no estudiadas hasta ahora, como Akt, y la repercusión de los grupos de fosforilación en la unión a la proteína β -arrestina mediante FRET o BRET. Todo esto para determinar el papel de cada grupo de residuos en particular en la señalización diferencial del receptor.

	COOH									
	442	477	486	492	507	515	516	518	543	
Wt	T	T	S	S	T	S	S	S	S	S
<u>VAATSSS</u>	T	V	A	A	T	S	S	S	S	S
<u>TSSVAAA</u>	T	T	S	S	V	A	A	A	S	S
<u>VAAVAAA</u>	T	V	A	A	V	A	A	A	S	S

Figura 47. Identificación de los grupos de sitios de fosforilación del α_{1D} -AR. Se muestran los grupos de sitios de fosforilación de la región carboxilo del α_{1D} -AR. VAATSSS, mutante individual del primer conglomerado; TSSVAAA, mutante individual del segundo grupo; VAAVAAA, mutante de ambos conglomerados en la región carboxilo. Las sustituciones son de Thr/Val y Ser/Ala.

Estudio del tráfico vesicular del α_{1D} -AR.

En el laboratorio hemos descrito que el α_{1B} -AR, otro de los miembros de la familia de receptores α_1 , sigue distintas rutas de tráfico vesicular durante su desensibilización homóloga y heteróloga (Castillo-Badillo et al., 2015). Se logró lo anterior, al emplear técnicas biofísicas (FRET) para analizar la interacción entre el receptor y proteínas que regulan el tráfico vesicular (Rabs) hacia endosomas tempranos y tardíos. No obstante, se desconoce el papel de los dominios intracelulares del α_{1D} -AR en la regulación de su tráfico intracelular. Por tal motivo, resulta interesante analizar la interacción de las mutantes del receptor reportadas en esta tesis, con proteínas Rab marcadoras de vesículas intracelulares.

Por ejemplo, la mutante carente del carboxilo, no es internalizada y se desensibiliza lentamente en respuesta a estímulos sostenidos. Para explicar este mecanismo, una posibilidad es que el receptor sea dirigido a vesículas muy cercanas a la membrana plasmática y regrese de inmediato a la membrana celular. Por lo que evaluar la interacción de esta mutante con Rab4, un marcador de vesículas de reciclaje rápido, es uno de los objetivos a futuro.

Además, estamos interesados en trazar las vías de tráfico de las mutantes al analizar la interacción con Rabs marcadoras de endosomas tempranos (Rab5), de endosomas tardíos (Rab9), vesículas de reciclaje tardío (Rab11), vesículas de degradación (Rab7) o cuerpos multivesiculares. En el laboratorio contamos con estos marcadores etiquetados con la proteína verde fluorescente (GFP). Sin embargo, se requiere de una proteína aceptora de energía para realizar los ensayos de interacción mediante FRET. La dsRed ha funcionado eficientemente en el laboratorio para estos fines. Por tal motivo, subclonamos algunas de las mutantes del receptor para generar

proteínas de fusión con esta molécula roja fluorescente en su región carboxilo (Fig. 48A). Ambas mutantes se expresan en la membrana plasmática (en rojo), ya que colocalizan (morado) con un marcador de membrana azul (Alexa) (Fig. 48B).

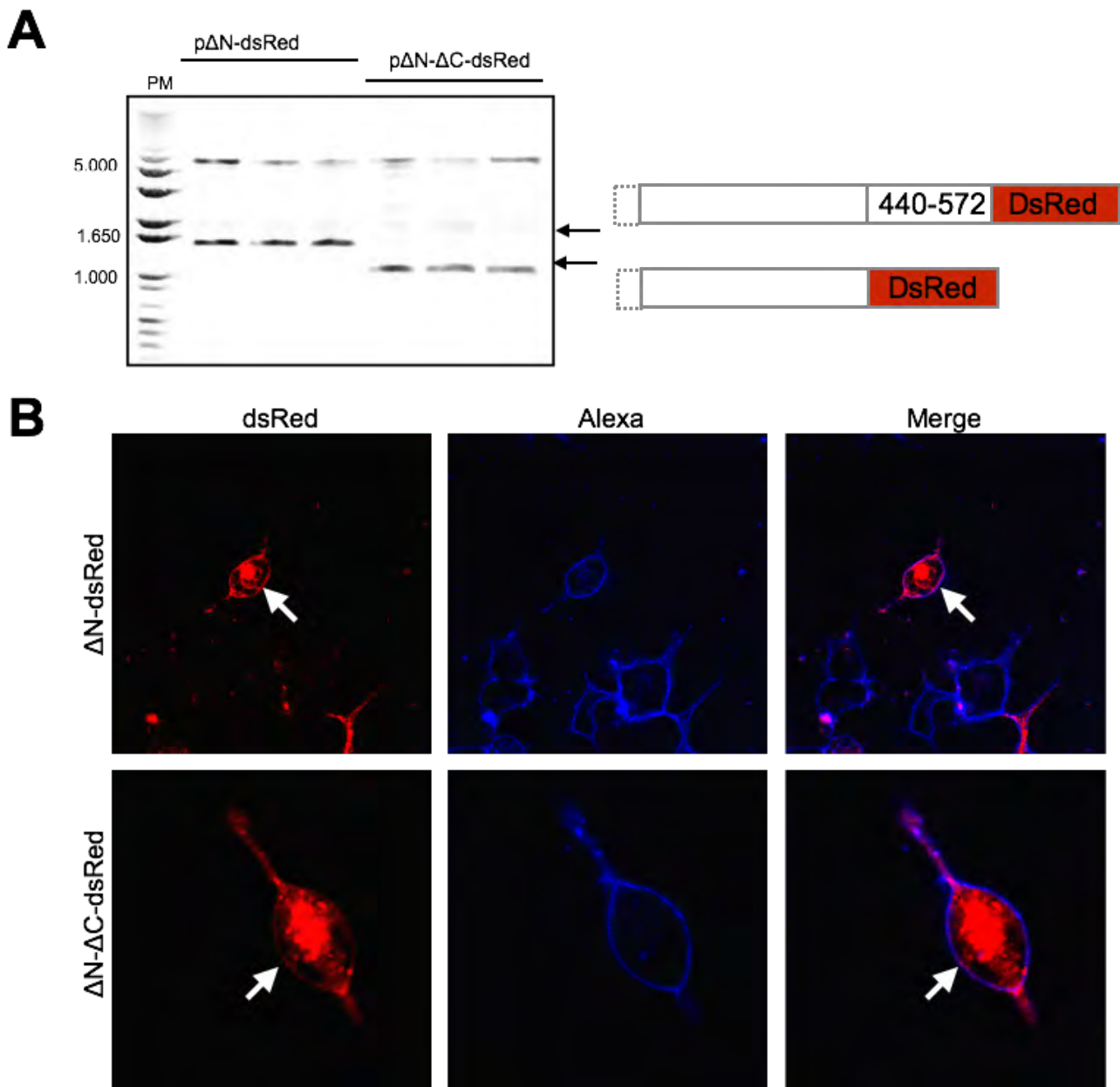


Figura 48. Generación y expresión de dos mutantes del α_{1D} -AR fusionadas a la proteína DsRed.

(A) Subclonación de los insertos del cDNA que codifica para el α_{1D} -AR truncado en la región carboxilo (ΔN) y truncado en el amino y el carboxilo ($\Delta N\Delta C$) en un plásmido que contiene a la proteína fluorescente DsRed. Se observa la liberación de los insertos (flechas) cortados con las enzimas EcoRI y NheI. (B). Expresión de las mutantes de (A). Imágenes de microscopía confocal. Receptor rojo; marcador de membrana azul; empalme en morado. Se indica la presencia del receptor en membrana con flechas.

También encontramos que una mutante del α_{1D} -AR truncada en la región carboxilo y con sustituciones S/A en todas las serinas de la tercera asa intracelular (Fig. 49A), fue incapaz de llegar a la membrana plasmática. Esto debido a que no se observa colocalización del receptor (verde) con el marcador de membrana (rojo) (Fig. 48B). Este dato sugiere que los sitios de fosforilación también podrían regular el tráfico anterógrado del receptor, aspecto que no ha sido estudiado. Por tal razón, estamos interesados en estudiarlo con la estrategia mencionada anteriormente.

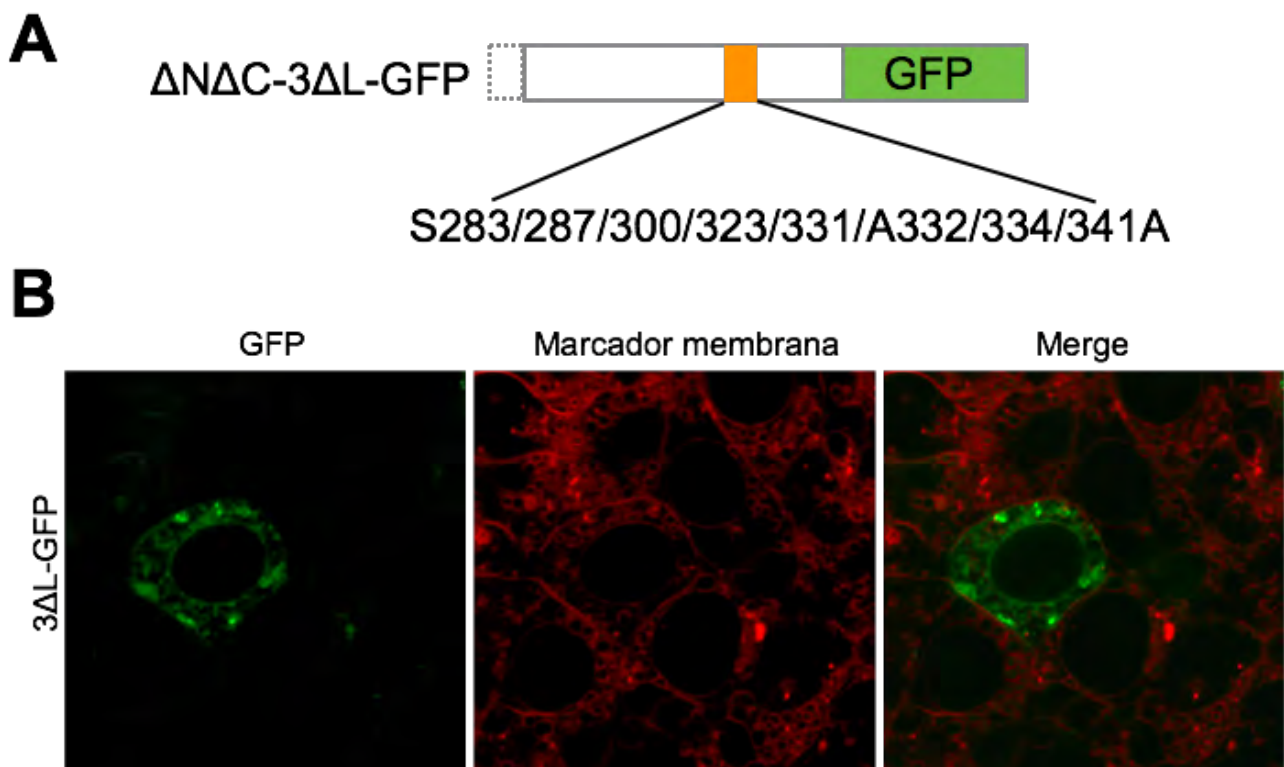


Figura 49. Otros residuos de serina en la tercera asa intracelular del α_{1D} -AR regulan su localización en la membrana plasmática. (A) Mutante del α_{1D} -AR truncada en la región amino, en el carboxilo y con las mutaciones puntuales en la tercera asa: S283/287/300/323/331/332/334/341A. **(B)** Imágenes de microscopía confocal. Receptor en verde, marcador de membrana en rojo.

Validación de las proteínas asociadas al α_{1D} -AR identificadas por MS.

Mediante el análisis de espectrometría de masas identificamos los sitios de fosforilación del receptor, parte de su secuencia y también nuevas proteínas asociadas (Ver Tabla 7). Sin embargo, queda por validar la asociación de estas proteínas mediante otras técnicas, así como determinar su repercusión funcional. Para lograr esto, es posible realizar ensayos de inmunoprecipitación del receptor combinados con Western blot para revelar la presencia de algunas de las proteínas candidatas. Lo anterior, en presencia o

ausencia de estímulos para determinar si las interacciones dependen de la activación del receptor.

Además, estamos interesados en evaluar las proteínas que interaccionan específicamente con los dominios intracelulares. Para lograrlo, generamos proteínas solubles que tienen la tercera intracelular del receptor fusionada con la proteína glutatión-S-transferasa (GST) para hacer ensayos de *pull-down* (Fig. 50A). Generamos variantes de la tercera asa con sustituciones de serina por alanina (S/A), para evitar que este dominio se fosforile (Fig. 50A). También generamos vectores con sustituciones de serina por aspártico (S/D), para mimetizar un estado constitutivo de fosforilación de esta región del receptor (Fig. 50A). Lo anterior, para evaluar posibles interacciones diferenciales de proteínas según el estado de fosforilación de la tercera asa intracelular. Hemos transformado bacterias de la cepa BL21 con las construcciones mencionadas y con la GST como control positivo y se observa un incremento en la expresión de una proteína que coincide con el peso molecular esperado (Fig. 50B). Por lo que mostramos que es posible purificar estas proteínas para realizar los ensayos de interacción utilizando la tercera asa como “carnada”.

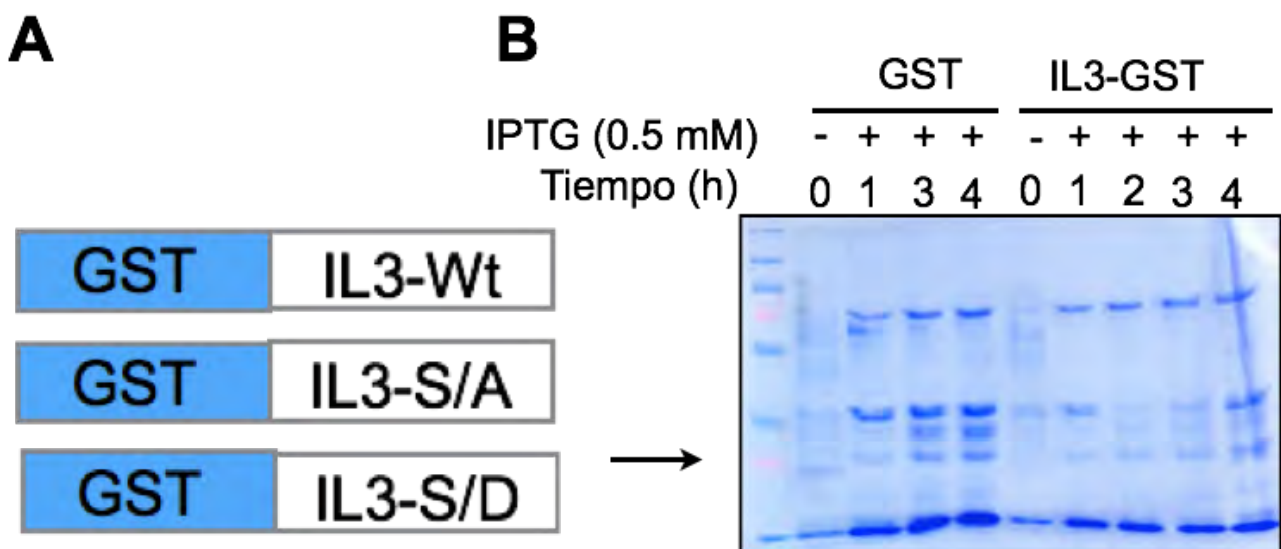


Figura 50. Generación y expresión de proteínas GST fusionadas a la tercera asa intracelular soluble del α_{1D} -AR. (A) Glutatión S transferasa soluble (GST) o proteínas quiméricas GST con la tercera asa intracelular: Wt, silvestre; S/A, mutaciones de residuos de serina por alanina; S/D, mutaciones de residuos de serina por ácido aspártico. **(B)** Inducción de la expresión de la GST y la GST fusionada a la tercera asa (IL3) silvestre con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5mM durante 1-4 h. Gel desnaturalizante teñido con azul de Coomassie. Se indica con una flecha la banda que corresponde al peso molecular de la proteína esperada.

Otra posibilidad es realizar la estrategia anterior, pero utilizando la región carboxilo soluble fusionada con GST. Esto para validar las proteínas que interaccionen específicamente con este otro dominio intracelular del receptor.

Mecanismo molecular de la dimerización de los receptores adrenérgicos α_{1D} y α_{1B} .

Se ha reportado que el receptores α_{1D} forman heterodímeros con el subtipo α_{1B} y que esta interacción regula su expresión en la membrana plasmática (Hague et al., 2004b). Sin embargo, se desconoce el fundamento molecular de esta interacción. Por otro lado, se sabe que algunos motivos localizado en hélices transmembranales, como el denominado zipper de glicina (GXXXG), son fundamentales en la interacción directa entre dos proteínas que contienen estos motivos (Kim et al., 2005). Al utilizar la herramienta Scanprosite, encontramos un zipper de glicina en la hélice transmembranal 4 (TM4) del α_{1D} -AR y tres en el α_{1B} -AR, en las TM1, 4 y 6 (Fig. 51A). Al modelar la estructura en 3D del α_{1D} -AR, observamos que el zipper de glicina se encuentra en la cara externa del alfa hélice 4 (Fig. 51B, morado). Estos datos sugieren que el α_{1D} -AR podría interaccionar directamente con alguno de los zippers de glicina que identificamos en la isoforma α_{1B} -AR. Por lo que una opción sería mutar estos motivos en ambos receptores marcados con dos etiquetas diferentes (GFP y DsRed) y evaluar las diferencias en su interacción mediante FRET y/o coimmunoprecipitaciones. De esta manera podríamos determinar si los zippers de glicina participan en la dimerización de estos receptores.

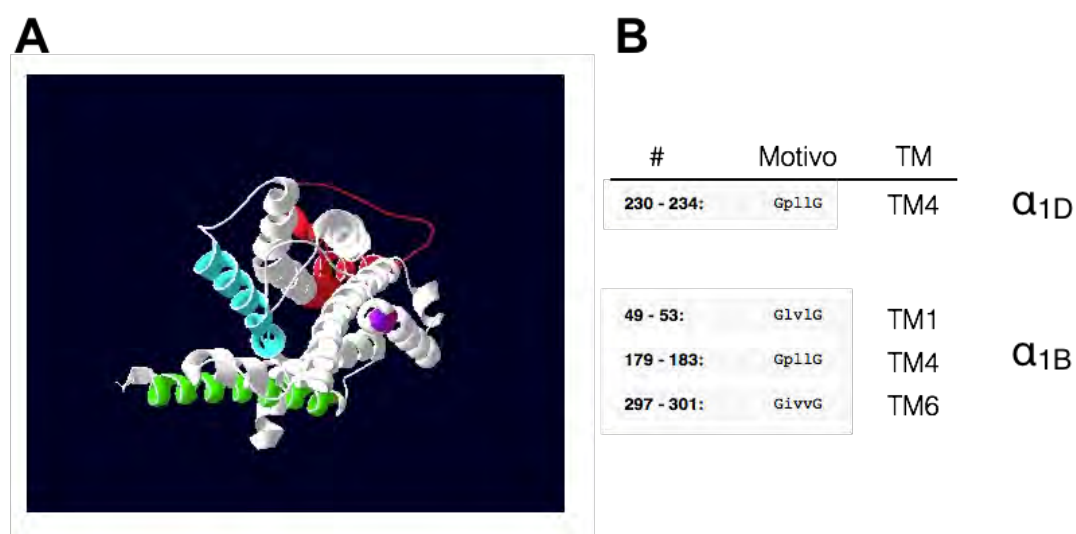


Figura 51. Identificación de los motivos GXXXG en los segmentos transmembranales de los receptores α_{1D} y α_{1B} adrenérgicos. (A) Modelo de la estructura del α_{1D} -AR. En morado se indica el motivo GXXXG (zipper de glicina) en la región transmembranal 4 (TM4). **(B)** Detección de los motivos GXXXG en los α_{1D} - y α_{1B} -AR mediante el programa Scanprosite.

Papel del α_{1D} -AR en el núcleo.

Al analizar la lista de nuevas proteínas asociadas al α_{1D} -AR obtenida mediante espectrometría de masas (Tabla 7), identificamos que varias de ellas son proteínas residentes del núcleo celular. Por otro lado, se ha identificado que los otros dos miembros de la familia α_1 , los subtipos α_{1A} y α_{1B} , pueden localizarse en el núcleo y regular desde ahí las vía de ERK. Sin embargo, no existe ningún reporte sobre la presencia y función del α_{1D} -AR en el núcleo. Por tal motivo, introdujimos la secuencia de este receptor en el programa NucPred, que predice sitios de localización nuclear (regiones positivas). Este programa encontró una zona de poli argininas con alta probabilidad de localización nuclear (Fig. 52A). Además, al transfectar células HEK293 con los α_{1D} -AR fusionados a GFP se encuentran en la membrana plasmática (Fig. 52B, en verde), puesto que colocalizan (amarillo) con el marcador de membrana (rojo). Luego de estimular las células con NA, observamos la desaparición del receptor en la membrana plasmática y una acumulación del mismo en una zona marcada con flecha (Fig. 52B). Al momento, desconocemos la zona de acumulación es el núcleo, pero podríamos determinarlo tiñiendo dicho organelo con marcadores como DAPI. También, observar si existe algún cambio la localización subcelular del receptor luego de eliminar la región de poliargininas. Además, es posible determinar si el receptor se encuentra en proximidad a alguna de las proteínas nucleares identificadas. Esto mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Por otro lado, hay reportes de receptores con actividad de cinasa de tirosina cuyos dominios intracelulares son proteolizados y posteriormente migran al núcleo, donde fungen como factores de transcripción (Sardi et al., 2006). Por lo que existe la posibilidad de que debido a su alta hidrofobicidad, no sea el receptor completo el que pudiera migrar al núcleo, sino alguno de sus dominios intracelulares solubles. Ya que la secuencia de localización nuclear predicha, se encuentra en la región carboxilo del receptor. Es posible probar la hipótesis planteada al generar proteínas de fusión de la región carboxilo con la proteína verde fluorescente y analizar su localización subcelular con la ayuda de un marcador de núcleo. Es posible realizar la misma estrategia pero con fragmentos de la tercera asa intracelular solubles fusionadas a GFP. Dichas construcciones ya fueron generadas y están disponibles en el laboratorio.

A**NucPred**The NucPred score for your sequence is 0.29 (see [score help](#) below)

```

1  MTFRDLLSVSFEGPRPDSSAGGSSAGGGGSSAGGAAPSEGPVGGVPGGA 50
51  GGGGGVVGAGSGEDNRSSAGEPGSAGAGGDVNGTAAVGGLVVSAQGVGVG 100
101 VFLAAFILMAVAGNLLVILSVACNRRLQVTNYFFIVNLAVADLLLSATVL 150
151 PFSATMEVLGFWAFGRAFCDVHAAVDVLCCTASILSLCTISVDRIYVGRH 200
201 SLKYPAINTEKAAAAILALLWVVALVVSVGPLLGWKEPVPPDERFCGITE 250
251 EAGYAVFSSVCSFYLPMAVIVVMYCRVYVVARSTTRSLEAGVKRERKAS 300
301 EVVLRIHCRGAATGADGAGHMRSAGHTFRSSLSVRLKFSREKKAATL 350
351 AIVVGVFVLCMFPPFFVLPGLSLFPQLKPSSEGVFKVIFWLGYPNSCVNPL 400
401 IYPCSSREFKRAFLRLRLCQCRRRRRRRLWVRVYGHWRASTSGLRQDCA 450
451 PSSGDAPPGAPLALTALPDPEPPGTPEMQAPVASRRKPPSAFREWRL 500
501 GPFRRPTTQLRAKVSSLSHKIRAGGAQRAEAACAQRSEVEAVSLGVPHEV 550
551 AEGATCQAYELADYSNLRETDI 572

```

Positively and negatively influencing subsequences are coloured according to the following scale:

(non-nuclear) negative ||||| positive (nuclear)

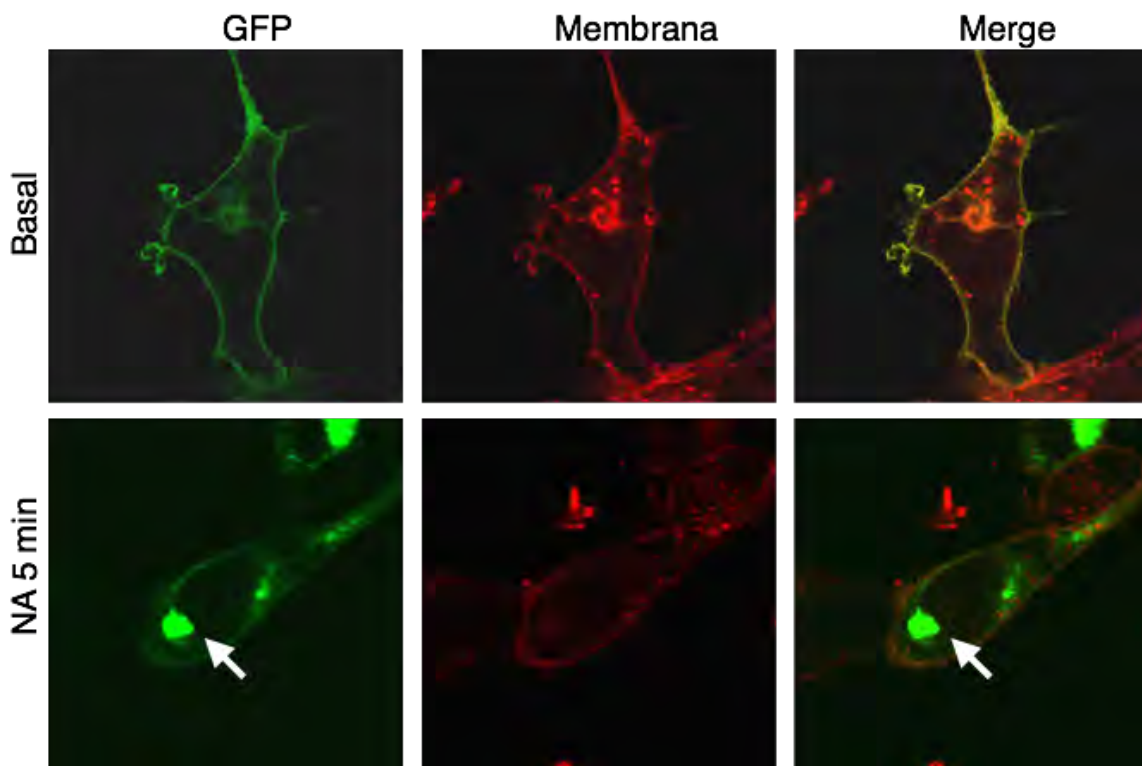
B

Figura 52. Identificación de una probable secuencia de localización nuclear del α_{1D} -AR. (A) Se muestra la secuencia de localización nuclear del α_{1D} -AR (RRRRRR) usando el programa NucPred. **(B)** Imágenes de microscopía confocal. Células que expresan el α_{1D} -AR en ausencia o presencia de noradrenalina (NA) 10 μ M por 5 min. Receptor en verde, marcador de membrana en rojo. Con flecha se indica la concentración del receptor en una región intracelular.

Evaluación de la función de las mutantes del α_{1D} -AR en sistemas endógenos.

En esta tesis encontramos diferencias en la señalización de mutantes del α_{1D} -AR. Sin embargo, todo el trabajo fue realizado en sistemas de sobre expresión de proteínas. Si bien estos sistemas tienen una serie de ventajas, la sola sobre expresión pudiera causar fenotipos no deseados. Por lo que vale la pena evaluar también la función de las mutantes que describimos en este trabajo, pero en sistemas de expresión endógena. Desafortunadamente, no existe una línea celular que exprese únicamente al subtipo α_{1D} -AR, y mucho menos un ratón transgénico que exprese mutantes del receptor. Por lo que una alternativa es el uso del sistema retroviral MoMLV (Moloney murine leukaemia virus) (Barquinero et al., 2004). Mediante estos virus modificados, es posible insertar, en prácticamente cualquier célula de mamífero que se divida, un transgen con bajo número de copias. Por esta razón, la expresión de la proteína es similar a un sistema endógeno. Además, este sistema es seguro, fácil de usar y permite obtener líneas estables.

Por lo anterior, generamos las mutantes del α_{1D} -AR que se muestran en la Figura 53 (panel superior) y las subclonamos en el sistema MoMLV (plásmido pS001). Posteriormente, generamos los retrovirus e infectamos las células de neuroblastoma de rata, B103 (Ver Anexo 12.5).

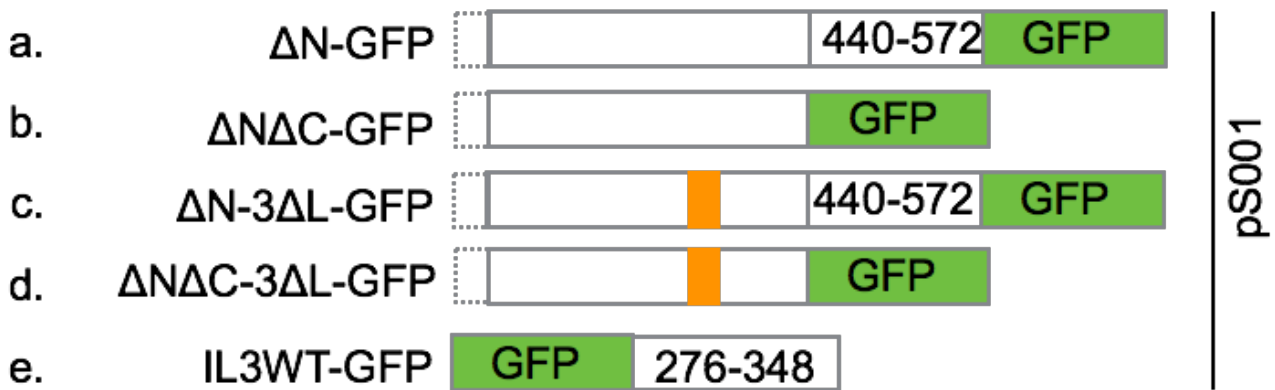


Figura 53. Mutantes del α_{1D} -AR en un sistema retroviral. (A) Mutantes del α_{1D} -AR en el sistema de retrovirus.

12.5 Anexo V: Generación de líneas celulares estables: sistema de retrovirus recombinantes.

Las células productoras de retrovirus, Φ NX, se sembraron en cajas de 10 cm de diámetro. Una vez alcanzada una confluencia del ~80 %, fueron transfectadas con 5 μ g de plásmido pS-001 y 15 μ L de GenJet (SignaGen) en un volumen final de 5.5 mL de DMEM suplementado con SFB al 10%. Se incubaron durante toda la noche con la mezcla anterior y posteriormente se reemplazó por medio DMEM suplementado. Las células se mantuvieron en dicho medio durante 48 h, luego de las cuales se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min. El sobrenadante, que contiene los virus, se filtró con una membrana de 0.4 μ M, se colocó en críotubos y se almacenó a -80 °C hasta el momento de su uso. Luego de recolectar los sobrenadantes, las células Φ NX se cultivaron en medio DMEM suplementado con puromicina 2 μ g/mL, hasta obtener células estables resistentes al antibiótico.

Veinticuatro h antes de la infección, se sembraron las células B103 a baja confluencia en cajas de 6 pozos (80,000 células/pozo). Se utilizaron 1.5 mL de sobrenadante viral en un volumen final de 2.5 mL de DMEM suplementado por cada pozo a infectar; a dicho volumen se agregaron 2.5 μ L de Polybrene 1,000X, se mezcló y se incubó en hielo durante 10 min. Se retiró el medio en el que crecían las células, se reemplazó por la mezcla viral/Polybrene. Se centrifugaron las células empleando un porta placas de columpio a 2,500 rpm durante 1.5 h a 28 °C. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, se retiró la mezcla viral y se reemplazó con DMEM suplementado. Se evaluó la expresión del reportero GFP 48 h después de la infección. Se separó la población de células GFP+ mediante citometría de flujo.

12.6 Anexo VI: Artículos y reconocimientos

El alumno Marco Antonio Alfonzo Méndez obtuvo el premio Daniel T. O'Connor para investigadores jóvenes en el área de catecolaminas durante el congreso Experimental Biology 2016, American Society of Pharmacology and Experimental Therapy - Catecholamine Society, San Diego, CA. Con el trabajo: " α_{1D} -adrenoceptors lacking their carboxyl terminus inhibit the MAPK/ERK pathway in Rat-1 fibroblasts".

El alumno contribuyó en los siguientes artículos durante su estancia en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas:

1. Carboxyl terminus-truncated α_{1D} -adrenoceptors inhibit the ERK pathway. **Alfonzo-Méndez MA**, Castillo-Badillo JA, Romero-Ávila MT, Rivera R, Chun J, García-Sáinz JA. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2016 Aug;389(8):911-20.1
2. Distinct phosphorylation patterns regulate α_{1D} -adrenoceptor signaling and desensitization. **Alfonzo-Méndez MA**, Carmona-Rosas G, Hernández-Méndez A, Hernández-Espinosa DA, Romero-Ávila MT, García-Sáinz JA. Manuscrito en preparación.
3. Novel structural approaches to study GPCR regulation. **Alfonzo-Méndez MA**, Alcántara-Hernández R, García-Sáinz JA. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 23;18(1). pii: E27. doi: 10.3390/ijms18010027. Review
4. Protein kinase C activation promotes α_{1B} -adrenoceptor internalization and late endosome trafficking through Rab9 interaction. Role in heterologous desensitization. **Alfonzo-Méndez MA**, Hernández-Espinosa DA, Carmona-Rosas G, Romero-Ávila MT, Reyes-Cruz G, García-Sáinz JA. *Mol Pharmacol*. 2017 Jan 12. pii: mol.116.106583. doi: 10.1124/mol.116.106583
5. α_{1B} -adrenergic receptors differentially associate with Rab proteins during homologous and heterologous desensitization. Castillo-Badillo JA, Sánchez-Reyes OB, **Alfonzo-Méndez MA**, Romero-Ávila MT, Reyes-Cruz G, García-Sáinz JA. *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0121165

*Los artículos 1-3 forman parte de esta tesis y se incluyen a continuación.

Carboxyl terminus-truncated α_{1D} -adrenoceptors inhibit the ERK pathway

Marco A. Alfonso-Méndez¹ · Jean A. Castillo-Badillo¹ · M. Teresa Romero-Ávila¹ · Richard Rivera² · Jerold Chun² · J. Adolfo García-Sáinz¹

Received: 2 March 2016 / Accepted: 25 April 2016 / Published online: 5 May 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Human α_{1D} -adrenoceptors are G protein-coupled receptors that mediate adrenaline/noradrenaline actions. There is a growing interest in identifying regulatory domains in these receptors and determining how they function. In this work, we show that the absence of the human α_{1D} -adrenoceptor carboxyl tail results in altered ERK (extracellular signal-regulated kinase) and p38 phosphorylation states. Amino terminus-truncated and both amino and carboxyl termini-truncated α_{1D} -adrenoceptors were transfected into Rat-1, HEK293, and B103 cells, and changes in the phosphorylation state of extracellular signal-regulated kinase was assessed using biochemical and biophysical approaches. The phosphorylation state of other protein kinases (p38, MEK1, and Raf-1) was also studied. Noradrenaline-induced ERK phosphorylation in Rat-1 fibroblasts expressing amino termini-truncated α_{1D} -adrenoceptors. However, in cells expressing receptors with both amino and carboxyl termini truncations, noradrenaline-induced activation was abrogated.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00210-016-1254-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Jean A. Castillo-Badillo is currently affiliated at Research Support Network, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, Universidad Nacional Autónoma de México (CIC-UNAM), Vasco de Quiroga 15, 14000 México, D.F, Mexico

✉ J. Adolfo García-Sáinz
agarcia@ifc.unam.mx

¹ Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, 04510 Mexico D. F, Mexico

² Department of Molecular and Cellular Neuroscience, Dorris Neuroscience Center, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA

Interestingly, ERK phosphorylation that normally occurs through activation of endogenous G protein-coupled receptors, EGF receptors, and protein kinase C, was also decreased, suggesting that downstream steps in the mitogen-activated protein kinase pathway were affected. A similar effect was observed in B103 cells but not in HEK 293 cells. Phosphorylation of Raf-1 and MEK1 was also diminished in Rat-1 fibroblasts expressing amino- and carboxyl-truncated α_{1D} -adrenoceptors. Our data indicate that expression of carboxyl terminus-truncated α_{1D} -adrenoceptors alters ERK and p38 phosphorylation state.

Keywords α_1 -adrenoceptors · Desensitization · GPCR · Carboxyl tail · ERK phosphorylation

Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) are targets of a large proportion of the therapeutic agents currently in use and constitute the most abundant type of membrane-bound receptors in mammals (Fredriksson and Schiöth, 2005, Lagerstrom and Schiöth, 2008, Lefkowitz, 2013). α_1 -Adrenoceptors (α_1 -ARs) belong to this group of receptors and comprise a subfamily that mediates some of the actions of adrenaline and noradrenaline. These receptors participate in the maintenance of homeostasis and play roles in the physiopathology of some diseases, such as hypertension and benign prostatic hyperplasia (García-Sáinz et al., 1999).

The α_{1D} -adrenoceptor is a member of the α_1 -AR subfamily (composed of α_{1A} , α_{1B} , and α_{1D} subtypes) (Hieble et al., 1995) and, like all GPCRs, is structurally characterized by seven transmembrane domains joined by three extracellular and three intracellular loops, with an extracellular amino terminus domain and an intracellular carboxyl tail (Hieble et al.,

1995, Lefkowitz, 2013). Agonist binding to α_{1D} -ARs triggers calcium mobilization through $G\alpha_q/11$, phosphoinositidase (phospholipase C) activation which generates diacylglycerol and inositol tris-phosphate (García-Sáinz and Villalobos-Molina, 2004). In addition, it has been shown that α_{1D} -AR activation stimulates the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway (Keffel et al., 2000, McCune et al., 2000, Waldrop et al., 2002).

Receptor phosphorylation is a very early event in desensitization of GPCRs. This allows β -arrestin binding and receptor internalization and triggers a second round of signaling (Lefkowitz, 2013). Receptor phosphorylation is mainly mediated by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and second messenger-activated protein kinases, such as protein kinases A and C (PKC) (Pitcher et al., 1998, Vázquez-Prado et al., 2003, Rajagopal et al., 2010) at regulatory domains, such as the third intracellular loop and the carboxyl tail (Lefkowitz, 2013). Therefore, there has been a growing interest in elucidating the function of these receptor domains.

Cottechia and coworkers showed that serine residues located specifically at the α_{1B} -AR carboxyl tail are targets of GRK and PKC and that substitution of these amino acids for non phosphorylatable residues, or the truncation of the receptor carboxyl tail, markedly decreases receptor phosphorylation and desensitization (Lattion et al., 1994, Diviani et al., 1997). This is in contrast with what has been observed with the α_{1D} -AR subtype, i. e., α_{1D} -AR-mediated calcium/phosphoinositide signaling, desensitization, and phosphorylation can take place in a carboxyl tail-truncated mutant (Rodríguez-Pérez et al., 2009). However, other pathways modulated by α_{1D} -ARs have not been studied.

Hence, the aim of this paper was to study the role of the human α_{1D} -AR carboxyl tail in MAP kinase pathway activation. We found that in Rat-1 fibroblast expressing the amino and carboxyl termini-truncated ($\Delta N\Delta C$) α_{1D} -AR mutant, the adrenergic activation of ERK (extracellular signal-regulated kinase) was greatly reduced. In addition, expression of this mutant also markedly decreased ERK phosphorylation induced by unrelated receptors, such as those for lysophosphatidic acid and epidermal growth factor. Phosphorylation of Raf-1 and MEK1 was also diminished in Rat-1 cells expressing the amino and carboxyl termini-truncated ($\Delta N\Delta C$) α_{1D} -AR mutant. Data indicate that this mutant receptor alters downstream step(s) in this pathway.

Material and methods

Reagents

(-)-Noradrenaline, phorbol myristate acetate, lysophosphatidic acid, bisindolylmaleimide I, prazosin, propranolol, and yohimbine were obtained from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis,

MO), Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, trypsin, G418, Lipofectamine 2000, streptomycin, penicillin, amphotericin B, and Fura-2AM were purchased from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). Epidermal growth factor was from Millipore Corporation (Billerica, MA). Polyvinylidene difluoride membranes were from BioRad (Hercules, CA) and SuperSignal West Pico Chemiluminescence kits were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Anti-phospho-p42/44 ERK (extracellular signal-regulated kinases) 1/2 (Thre202/Tyr204), anti-total ERK (p42/44), anti-phospho c-Raf-1 (Ser338), anti-total c-Raf-1, anti-phospho MEK1 (Ser217/Ser221), and anti-total MEK-1 antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA); anti-total ERK2 p42 monoclonal antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Plasmids

The cytoplasmic ERK activity reporter EKAR (EGFP (enhanced green fluorescent protein)-mRFP (monomeric Red Fluorescent Protein)) (Harvey et al., 2008), was purchased from Addgene (Cambridge, MA).

Plasmids coding for HA-tagged human α_{1D} -adrenoceptor ($\Delta 1-79$, amino terminus-truncated, ΔN) and ($\Delta 1-79$ and $441-572$, amino and carboxyl termini-truncated, $\Delta N\Delta C$) were previously reported (Rodríguez-Pérez et al., 2009). Plasmid coding for carboxyl terminus GFP-tagged proteins of the mutants described above (ΔN -GFP and $\Delta N\Delta C$ -GFP) were synthesized commercially by Mutagenex Inc.

Cell lines

Rat-1 (rat fibroblasts), HEK 293 (human embryonic kidney cells), and B103 cells (rat neuroblastoma cells) were obtained from the American Tissue Culture Collection. Generation of Rat-1 cell lines expressing the α_{1D} -adrenoceptor deletion mutants was previously reported (receptor density ~ 1500 fmol/mg membrane protein) (Rodríguez-Pérez et al., 2009). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, G418 300 μ g/ml, streptomycin 100 μ g/ml, penicillin 100 U/ml and amphotericin B 0.25 μ g/ml. Cells were cultured at 37 °C, under a 95% air/5% CO₂ atmosphere. HEK 293 and B103 cells were transfected with the GFP-tagged human α_{1D} -adrenoceptor (ΔN -GFP and $\Delta N\Delta C$ -GFP) indicated above. In the case of HEK 293 cells, transient transfection was used because expression was very robust, as evidenced by fluorescent confocal microscopy and calcium responsiveness to noradrenaline plus propranolol (the β -adrenergic antagonist was used in all experiments using these cells, due to the endogenous expression of these receptors). Cells were

transfected with 1 μg of plasmid DNA per 2.5-cm dish using Lipofectamine 2000 and harvested 48 h later. B103 cells were transfected in an identical manner; however, because receptor expression was not as robust as that observed in HEK 293 cells, selection was performed using G418 (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ initially (approximately for 1 month, 4–5 cell passages) and reduced afterwards to 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Intracellular calcium determinations

Intracellular calcium concentration was assessed as previously described (Rodríguez-Pérez et al., 2009). In brief, cells were serum-starved overnight, then loaded with 2.5 μM of the fluorescent Ca^{2+} indicator, Fura-2/AM, in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4 for 1 h at 37°C, and then washed three times to eliminate unincorporated dye. Fluorescence measurements were carried out at 340- and 380-nm excitation wavelengths and at a 510-nm emission wavelength, with a chopper interval set at 0.5 s, utilizing an Aminco-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (Rochester, NY). Intracellular calcium levels were calculated according to Grynkiewicz et al. (Grynkiewicz et al., 1985).

Western blot assays

Cells were serum-starved overnight; after stimulation with the indicated agents, they were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed with Laemmli sample buffer (Laemmli, 1970). Lysates were centrifuged at 12,700 $\times g$ for 5 min and proteins in supernatants were separated by electrophoresis on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes and immunoblottings were performed. Duplicate samples were run in parallel to determine total- and phospho-kinases. Incubation with primary selective antibodies was conducted for 12 h at 4 °C and with the secondary antibody for 1 h at room temperature. SuperSignal West Pico chemiluminescence kits were employed, exposing the membranes to X-Omat X-ray films. Signals were quantified by densitometric analysis. Cells expressing the ΔN or the $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ $\alpha_{1\text{D}}$ -adrenoceptor were cultured in parallel and were subjected to the same treatments in all the experiments; afterwards, samples were subjected to electrophoresis, electrotransference, and immunoblotting in the same gels and membranes; representative Western blots are presented in the figures. For data normalization, the treatment that resulted in a consistent bigger response was considered as 100% (indicated in the figures). Anti-total ERK or anti-total ERK 2 antibodies were used in the different experiments obtaining identical results.

FRET-based ERK activity reporter assays

Rat-1 cells expressing the ΔN or $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ $\alpha_{1\text{D}}$ -adrenoceptors were transfected with a cytoplasmic extracellular signal-regulated kinase activity reporter plasmid (EKAR, EGFP-mRFP) (Harvey et al., 2008) using Lipofectamine 2000. EKAR is a genetically encoded, fluorescence resonance energy transfer-based sensor of ERK activity. This reporter contains an EKR substrate peptide, an ERK docking domain, a phospho-binding domain, and, at the amino and carboxyl termini, mRFP and EGFP, respectively (Harvey et al., 2008). ERK substrate peptide phosphorylation, by the endogenous protein kinase, triggers a reporter conformational change, which allows proximity of the fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Harvey et al., 2008). Confocal images were obtained 48 h post transfection using an Olympus Fluoview FV 100 laser confocal system attached/interfaced to an Olympus IX81 inverted light microscope with a $\times 60$ water immersion objective; EGFP was excited at 488 nm and emission was simultaneously recorded at the green (500–530 nm) and red (555–655 nm) channels. Confocal images were viewed and processed employing FV10-ASW 1.6 software (Olympus).

Statistical analysis

Statistical analysis between groups was performed using analysis of variance with Bonferroni's post-test and was carried out with the software included in the GraphPad Prism program. In all statistical comparisons, $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Amino terminus ($\Delta 1-79$) (ΔN)-truncated mutant was used to improve receptor plasma membrane expression as it has been described (Pupo et al., 2003, Hague et al., 2004, García-Sáinz et al., 2010). In order to determine the role of the $\alpha_{1\text{D}}$ -adrenergic carboxyl terminus in signaling, a mutant with this deletion of the amino terminus ($\Delta 1-79$) (ΔN) and another with an additional carboxyl terminus deletion ($\Delta 441-572$) ($\Delta\text{N}\Delta\text{C}$) were expressed in Rat-1 cells (Rodríguez-Pérez et al., 2009) and changes in ERK phosphorylation and intracellular calcium were assessed. In cells expressing the ΔN mutant, we observed a subtle basal level of ERK phosphorylation that was markedly increased after 1 and 5 min of noradrenaline stimulation, and returned to near baseline after 30 min (Fig. 1a). In contrast, in cells expressing the $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ receptor ERK phosphorylation in response to noradrenaline was either very weak or absent (Fig. 1a). Despite this differential response, cells expressing the ΔN and the $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ mutant were able to show similar robust increases in intracellular calcium concentration upon

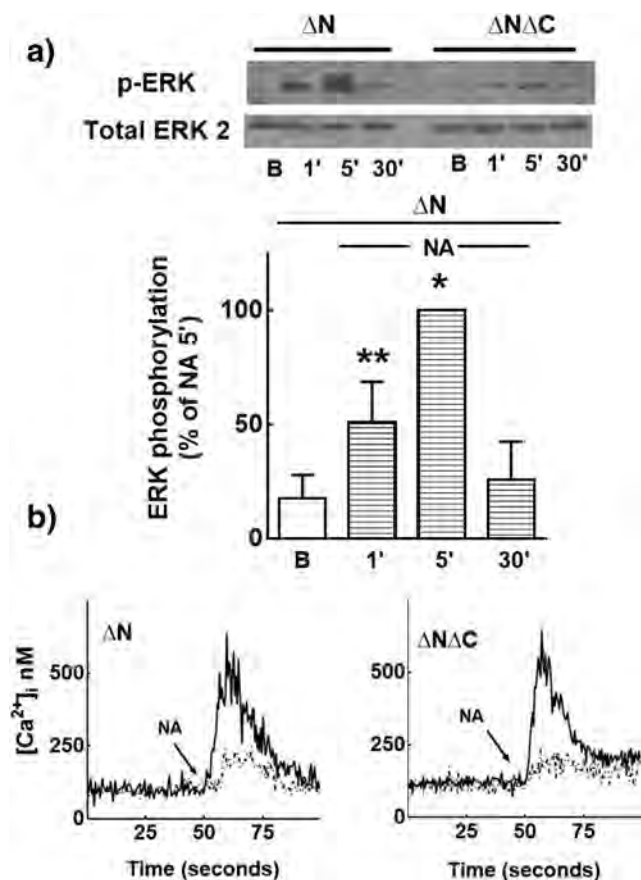


Fig. 1 Effect of noradrenaline on ERK phosphorylation and intracellular calcium concentration. **a** Rat-1 fibroblasts expressing ΔN or $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors were stimulated with 10 μM noradrenaline (NA) for 1, 5 and 30 min. The response of cells expressing ΔN α_{1D} -adrenoceptors was normalized to the effect of 10 μM noradrenaline (NA) (5 min, maximum observed) considered as 100 %. No quantitative data of cells expressing $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors are presented because these were very small and in most cases absent. Plotted are the means and vertical lines representing the S.D. of 3 experiments using different cell preparations. * $p < 0.001$ vs. baseline (B); ** $p < 0.05$ vs. baseline (B). Representative Western blots for phospho-ERK 1/2 (p-ERK) and total ERK 2 are presented. **b** Intracellular calcium determinations using Rat-1 fibroblasts expressing amino terminus-truncated (ΔN) (left graph) or amino and carboxyl termini-truncated ($\Delta N\Delta C$) (right graph) α_{1D} -adrenoceptors; cells were stimulated with 10 μM noradrenaline (NA) (arrow); cells were preincubated for 5 min in the absence (solid line) or presence (dotted line) of 1 μM phorbol myristate acetate

noradrenaline stimulation and preincubation with phorbol myristate acetate, to activate PKC, markedly reduced the adrenergic effect in both mutants (Fig. 1b), confirming our previous observations (Rodríguez-Pérez et al., 2009).

No ERK phosphorylation was observed in non-transfected Rat-1 control fibroblast in response to noradrenaline alone or in the presence of α_1 - (prazosin), α_2 - (yohimbine), or β -adrenergic (propranolol) blockers (Supplementary Fig. S1); however, these cells exhibited a strong ERK phosphorylation in response to lysophosphatidic acid (Supplementary Fig. S1). Similarly, no response to noradrenaline in calcium signaling was observed (data not shown).

Puzzled by the inhibition of ERK signaling in cells expressing the $\Delta N\Delta C$ receptor mutant, we explored whether such effect was selective for the α_{1D} -adrenergic action or a more general phenomenon, affecting the action of other receptors. We studied the effect of agents known to have endogenous receptors expressed in Rat-1 fibroblasts such as lysophosphatidic acid (Fig. 2a), whose signaling is mediated through GPCRs, and epidermal growth factor, that signals through receptor tyrosine kinases (ErbB receptors) (Fig. 2b). In both cases, a classic time-dependent ERK phosphorylation was observed in cells expressing the ΔN mutant, but it was markedly diminished, and most frequently absent, in cells expressing $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors (Fig. 2a, b). It goes by default that α_{1D} -adrenoceptor activation was not necessary to observe these carboxyl terminus-truncated mutant effects.

ERK phosphorylation has complex space temporal dynamics. For this reason and in order to confirm the previous findings, we employed a genetically encoded FRET-based ERK activity reporter. Endogenously expressed LPA receptors were stimulated in cells expressing ΔN or $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptor mutants. An increase in FRET signal was observed upon stimulation with 1 μM lysophosphatidic acid in cells expressing the ΔN mutant receptor (Fig. 3a); in contrast, no FRET signal was detected in cells expressing $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors, under the same conditions (Fig. 3b). These results are consistent with our former findings and provide additional proof that the α_{1D} -adrenoceptor controls activation of the ERK pathway even if activation of that pathway occurs through non-related receptor-ligand interactions.

To determine if the effect of $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptor expression, on ERK phosphorylation, was cell-specific, ΔN and $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptor constructs were transiently expressed in HEK293 cells. Surprisingly, in these cells, 10 μM noradrenaline (plus propranolol 1 μM , to block endogenous β -adrenoceptors) and 1 μM lysophosphatidic acid clearly increased ERK phosphorylation (Fig. 4a). Similar experiments were performed in B103 cells except that stably transfections were used, and the truncated receptors, fused to GFP at their respective carboxyl termini, were expressed to rapidly and easily detect receptor expression by fluorescent microscopy (expression was also checked by noradrenaline-induced intracellular calcium increases; data not shown). In these cells, very robust noradrenaline- and EGF-mediated ERK phosphorylations were observed in cells expressing the ΔN mutant receptor (Fig. 4a); interestingly, similar to the effects observed in Rat-1 fibroblasts, the activity of these agents was markedly and consistently attenuated in cells expressing the $\Delta N\Delta C$ mutant receptor (Fig. 4b).

To investigate the mechanism through which ERK signaling is inhibited in $\Delta N\Delta C$ -expressing Rat-1 fibroblasts, we tried to identify a pathway element that blocks transduction. Our first candidate was PKC for the following reasons: (a) both (ΔN and $\Delta N\Delta C$) mutant receptors respond to agonist

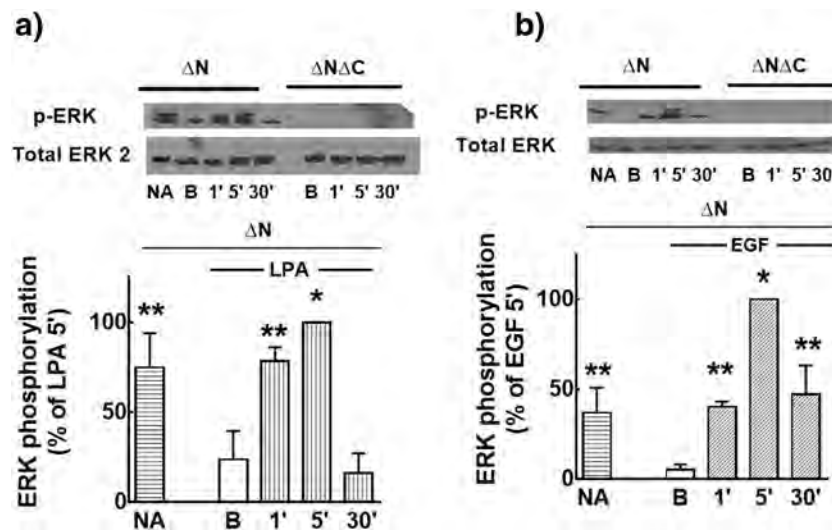


Fig. 2 Effects of lysophosphatidic acid and EGF on ERK phosphorylation. **a** Representative Western blots of phospho ERK 1/2 (42–44 kDa) and total ERK 2. Rat-1 fibroblasts expressing ΔN or $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors were stimulated with 10 μM noradrenaline (NA) (positive control) for 5 min or with 1 μM lysophosphatidic acid (LPA) for 1, 5 and 30 min. The response of cells expressing ΔN α_{1D} -adrenoceptors was normalized to the maximal effect (1 μM lysophosphatidic acid (5 min)) as 100 %. *B* indicates baseline levels. **b**

Experiments were performed as indicated for **a** except that 100 ng/ml EGF was used in the time course and the effects were normalized to the effect of EGF (5 min) considered as 100 %. Quantitative data of cells expressing $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors are not presented because they were very small or absent. In both panels, plotted are the means and vertical lines representing the S.D. of 3–4 experiments using different cell preparations. * $p < 0.001$ vs. baseline (*B*); ** $p < 0.01$ vs. baseline (*B*)

stimulation by increasing intracellular calcium, and both are phosphorylated and desensitized by PKC activation (Rodríguez-Pérez et al., 2009) (see also Fig. 1); (b) in addition, it has been shown that PKC is able to directly phosphorylate and activate Raf-1 (MAP Kinase Kinase Kinase) in vitro and in vivo (in NIH 3T3 fibroblasts) (Kolch et al., 1993). Therefore, we tested whether PKC could be involved in ERK activation in our model. To do this, Rat-1 fibroblasts expressing ΔN mutant receptors were incubated for 30 min in the absence or presence of the general PKC inhibitor, bisindolylmaleimide (1 μM). Then, we assessed ERK phosphorylation after noradrenaline stimulation during 1, 5, and 30 min. We observed a marked increase of ERK phosphorylation in cells incubated in the absence of the inhibitor (positive control), but no signal in cells pretreated with bisindolylmaleimide I (Fig. 5a). The inhibitor alone did not alter either basal or EGF-mediated ERK activation (Fig. 5, panel B). These data indicated that noradrenaline-induced (but not EGF-induced) ERK activation is PKC dependent (Supplementary Fig. S2).

To provide additional evidence that PKC plays a role in ERK activation in ΔN -expressing cells, we pharmacologically activated this enzyme, using phorbol myristate acetate, in both ΔN - and $\Delta N\Delta C$ -expressing Rat-1 fibroblasts. ERK phosphorylation was markedly increased in cells expressing the ΔN mutant receptors activated with this phorbol ester, but not in those expressing $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors (Fig 6a, Supplementary Fig. S2). Therefore, in these $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptor-expressing cells, direct activation of PKC was not able to turn on ERK signaling, but was capable of

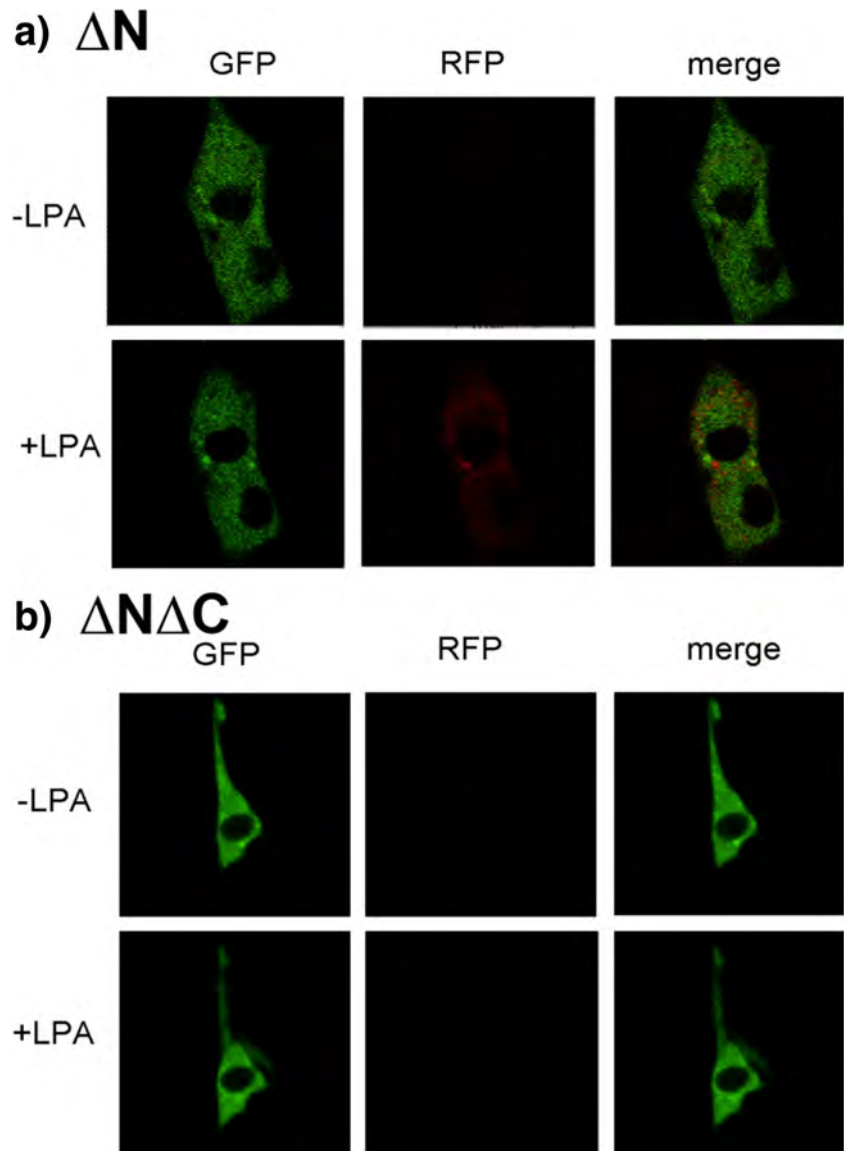
desensitizing and inducing α_{1D} -adrenoceptors phosphorylation (Rodríguez-Pérez et al., 2009). Taken together these data indicate that the pathway is inhibited downstream of PKC. Therefore, we evaluated the phosphorylation state of kinases Raf-1 and MEK-1. We observed that phorbol myristate acetate increased phosphorylation of both Raf-1 and MEK1 in cells expressing the ΔN receptor mutant but not in cells expressing the $\Delta N\Delta C$ receptor mutant (Fig. 6b). This means that, in cells expressing $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors, phorbol esters cannot activate ERK signaling from the Raf-1 kinase on, despite being able to activate PKC (as shown by α_{1D} -adrenoceptor desensitization and phosphorylation (Fig. 1 and (Rodríguez-Pérez et al., 2009)) (Supplementary Fig. S2).

Finally, we explored whether other MAP kinase pathway branches were similarly affected, i. e., p38. In Rat-1 fibroblasts expressing the ΔN α_{1D} -adrenoceptor mutant, baseline p38 phosphorylation showed some variability but its phosphorylation was clearly increased by noradrenaline or phorbol myristate acetate (Fig. 7). In contrast, in cells expressing $\Delta N\Delta C$ mutant receptors, p38 was markedly phosphorylated under baseline conditions (Fig. 7). No further effect was produced by noradrenaline and only a marginal increase was observed in response to the active phorbol ester (Fig 7).

Discussion

The major finding of the present work is that the amino- and carboxyl-termini-truncated mutant α_{1D} -adrenoceptors

Fig. 3 Effect of lysophosphatidic acid on ERK phosphorylation detected using the FRET-based activity sensor, EKAR. Rat-1 fibroblasts expressing ΔN or $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors and transfected with the cytoplasmic ERK Activity Reporter (EKAR, EGFP-mRFP) were stimulated with 1 μ M lysophosphatidic acid for 5 min and observed with a confocal microscope. Excitation was at 488 nm and emission was simultaneously recorded in the *green* (GFP) and *red* channels (RFP); *merged images* are also shown. In these experiments mRFP was not directly excited at any time



($\Delta N\Delta C$) was able to signal through the phospholipase C/ IP_3 -calcium mobilization pathway (Rodríguez-Pérez et al., 2009) but that signaling through the MAP kinase pathway was markedly altered. The data indicate that the actions of this receptor are biased. On one side, the sole expression of this receptor mutant markedly diminished signaling of one of the MAP kinase pathway branches, ERK 1/2, and that this happens not only through the receptor itself but also through other unrelated GPCRs, receptor tyrosine kinases, such as the EGF receptor, and even through pharmacological activation of PKC; in other words, the $\Delta N\Delta C$ receptor behaves as a dominant negative mutant. On the other side, the sole expression of the $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors was sufficient to increase p38 phosphorylation to near maximal levels, and the natural adrenoceptor agonist, noradrenaline, or pharmacological PKC activation, were unable to further increase it, i. e.,

$\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors behave as a constitutively active mutant for this MAP kinase branch.

It should be kept in mind that an amino truncation of the receptor was utilized to increase its membrane expression, and that signaling was similar to what has been reported for other GPCRs ((Pupo et al., 2003, Rodríguez-Pérez et al., 2009) and present work). Therefore, the changes observed with the carboxyl-truncated receptor should be attributed to the absence of this domain.

Wild type α_{1D} -adrenoceptor-induced ERK phosphorylation has been studied by another group (Pérez-Aso et al., 2013) and there are some similarities with our data with the ΔN receptor-expressing cells. However, those experiments were performed using HEK 293 cells and ERK phosphorylation was not altered by inhibition of protein kinase C (Pérez-Aso et al., 2013). It is possible that the difference in the cell

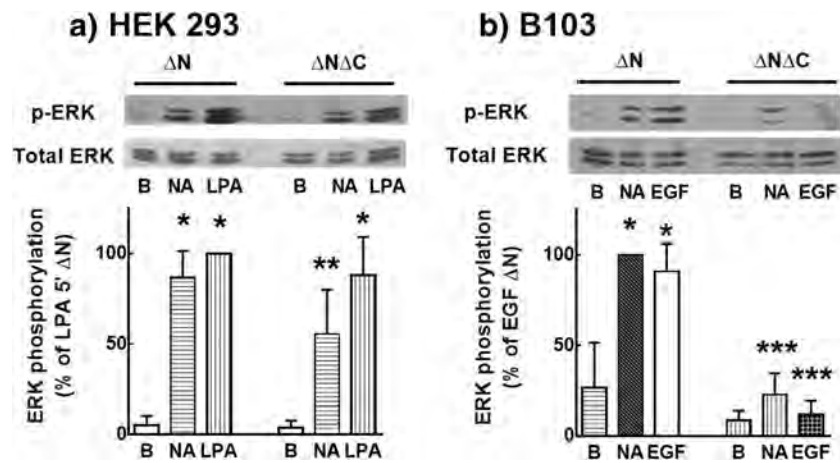


Fig. 4 Expression of ΔN or $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors in HEK 293 and B103 cells show that the ERK phosphorylation effects are cell-type specific. HEK 293 (a) and B103 (b) cells transfected to express ΔN or $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors were incubated for 5 min in the absence (B, baseline) or presence of 10 μM noradrenaline plus 1 μM propranolol (NA), 1 μM lysophosphatidic acid (LPA) or 100 ng/ml EGF and ERK phosphorylation was determined by Western blotting. The response was

normalized to the maximal effect observed (lysophosphatidic acid (a) or EGF (b) in ΔN α_{1D} -adrenoceptor-expressing cells) considered as 100 %. In both panels, the means are plotted and vertical lines represent the S.D. of 4–6 experiments using different cell preparations. * $p < 0.005$ vs. its respective baseline (B); ** $p < 0.01$ vs. its respective baseline (B); *** $p < 0.005$ vs. same treatment in cells expressing ΔN α_{1D} -adrenoceptors. Representative Western blots are shown

types employed could explain the distinct roles of PKC in the adrenergic action and that this might be related to the fact that expression of $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptor in such cells did not alter ERK phosphorylation.

To the best of our knowledge, no similar effects have been reported for other GPCR mutants. However, there is evidence that mutants of signaling proteins and also of scaffolding proteins exert marked effects on the MAP kinase pathway, for example, β -arrestin 3 and glutathione S-transferase P1 (Breitman et al., 2012, Okamura et al., 2015). It is known that

β -arrestins bind to GPCRs during their desensitization/signaling switch and that these proteins are involved in regulating the MAP kinase pathway (Breitman et al., 2012, Lefkowitz, 2013). In this regard, a study using different β -arrestin mutants has shown that GPCR binding, interaction with the MAP kinase JNK3 (c-Jun N-terminal Kinase 3), and the ability to modulate this kinase are three distinct functions of this scaffold protein (Breitman et al., 2012). Among the mutants, one containing 12 alanine substitutions of the key receptor-binding residues was unable to bind β_2 -adrenoceptors

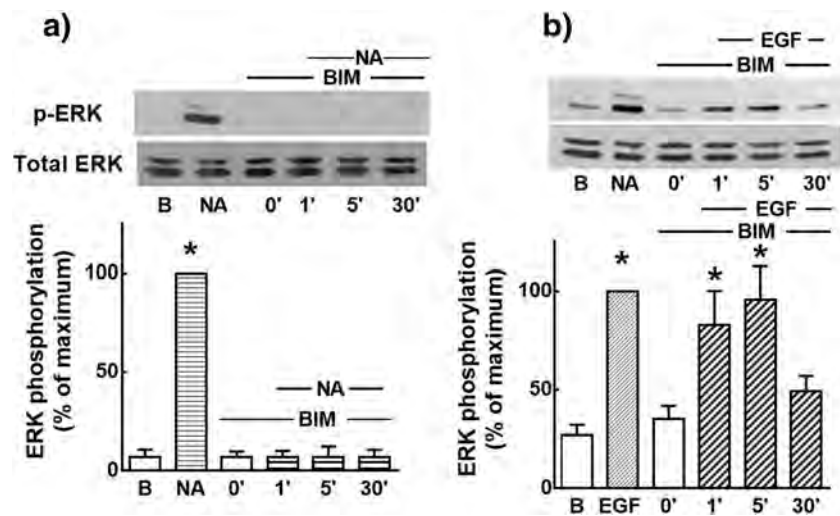


Fig. 5 Roles of protein kinase C in noradrenaline- and EGF-induced ERK phosphorylation. Rat-1 fibroblast expressing ΔN α_{1D} -adrenoceptors were pre-incubated for 30 min with 1 μM bisindolylmaleimide I (BIM) and then challenged for the times indicated with 10 μM noradrenaline (NA) (a) or 100 ng/ml EGF (b) and ERK phosphorylation was determined by Western blotting. Internal controls included preincubation for 30 min with vehicle and incubation for 5 min in the absence (B, baseline) or presence of 10 μM

noradrenaline (NA) (a) or 100 ng/ml EGF (b). Data were normalized to the maximal observed effect (noradrenaline (a), EGF (b)) considered as 100 %. In both panels, the means are plotted and vertical lines represent the S.D. of 4–6 experiments using different cell preparations. * $p < 0.005$ vs. its respective baseline (B). Representative Western blots for phospho-ERK (p-ERK) and total ERK are shown

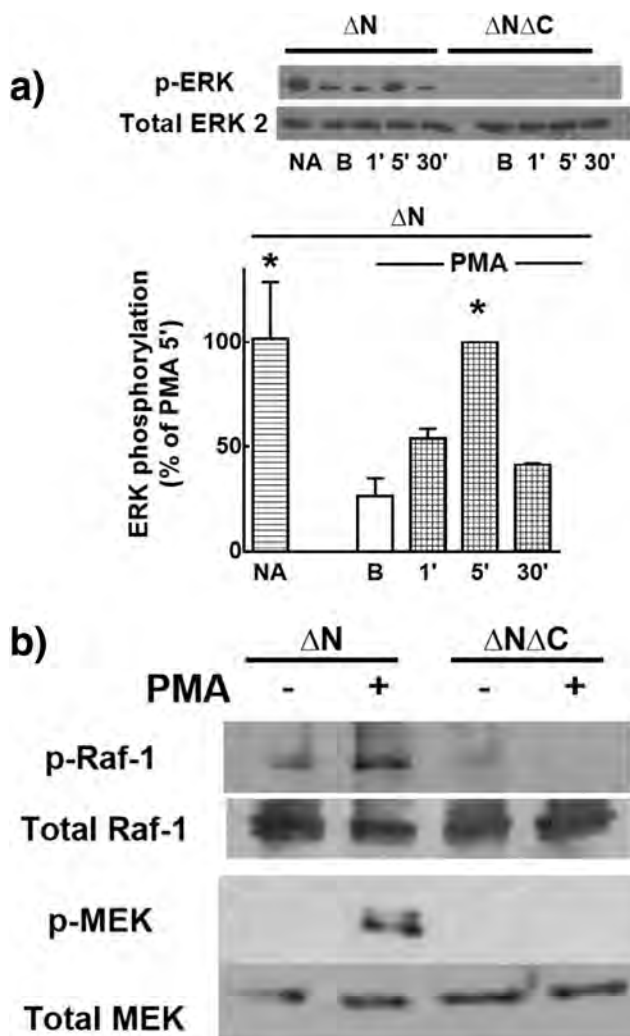


Fig. 6 Effect of phorbol myristate acetate on the phosphorylation of the MAP kinases: ERK, Raf-1 and MEK. Rat-1 fibroblast expressing ΔN or $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors were incubated with 1 μ M phorbol myristate acetate (PMA) and ERK, Raf-1 and MEK phosphorylation was determined by Western blotting. In **a**, cells were incubated for the indicated times in the presence of 1 μ M PMA; 10 μ M noradrenaline (NA) for 5 min was used as a positive control. Data were normalized to the maximal observed effect (phorbol myristate acetate, 5 min) considered as 100 %. No quantitative data of cells expressing $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors are presented because these were very small and in most cases absent. The means are plotted and vertical lines represent the S.D. of 4–6 experiments using different cell preparations. * $p < 0.005$ vs. its respective baseline (B). Representative Western blots for phospho-ERK (p-ERK) and total ERK 2 are shown. In **b**, representative Western blots showing total and phosphorylated Raf-1 and MEK are presented. These experiments were repeated four times for each kinase using different cell preparations, obtaining the same results

but was able to inhibit JNK3 activation by wild type β -arrestin (Breitman et al., 2012). Similarly, it was recently reported that tyrosine phosphorylation of glutathione S-transferase P1, by the EGF receptor, favors the transferase interaction with JNK and inhibits downstream signaling of this MAP kinase pathway (Okamura et al., 2015). In addition, it has been observed that β_2 -adrenoceptors bind to membrane-associated guanylate

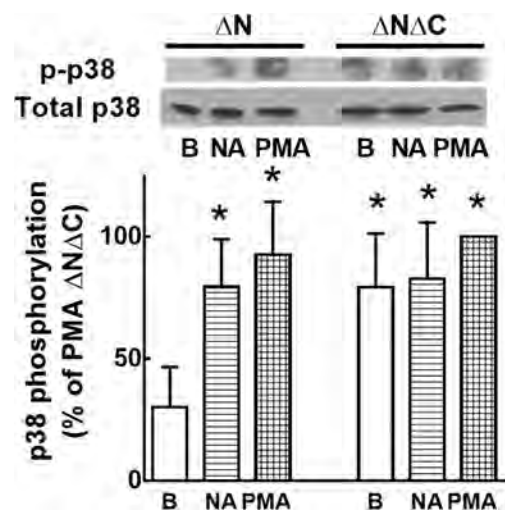


Fig. 7 Effect of noradrenaline and phorbol myristate acetate on p38 phosphorylation. Rat-1 fibroblast expressing ΔN or $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors were incubated with 10 μ M noradrenaline (NA) or 1 μ M phorbol myristate acetate (PMA) for 5 min and p38 phosphorylation was determined by Western blotting. The response was normalized to the maximal effect observed (phorbol myristate acetate in $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptor-expressing cells) considered as 100 %. Plotted are the means and vertical lines representing the S.D. of 4–6 experiments using different cell preparations. * $p < 0.005$ vs. ΔN baseline (B). Representative Western blots for phospho-p38 (p-p38) and total p38 are shown

kinase inverted-3 (MAGI-3) and that such association substantially retards ERK activation by the adrenoceptor (Yang et al., 2010).

It has been previously shown that α_{1D} -adrenoceptors are phosphorylated and desensitized by phorbol ester-mediated activation of PKC (García-Sáinz et al., 2001, García-Sáinz et al., 2004, Rodríguez-Pérez et al., 2009). These effects were observed with wild-type receptors and also when the ΔN and $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenergic mutant receptors were utilized ((García-Sáinz et al., 2001, García-Sáinz et al., 2004, Rodríguez-Pérez et al., 2009) and present work). Therefore, it is clear that PKC is functional in cells expressing the carboxyl-tail truncated receptors. α_{1D} -Adrenergic-stimulated ERK phosphorylation is PKC mediated, as evidenced by the blockade induced by the inhibitor, bisindolylmaleimide I. Investigation on the phosphorylation state of the intermediate kinases, Raf-1 and MEK indicated that signaling is blocked after PKC.

Interestingly Raf-1 is modulated through phosphorylation by PKC (Kolch et al., 1993) and also by growth factor receptors containing endogenous tyrosine kinase activity, such as the EGF receptor, with the key involvement of Ras GTPase activity (Kolch et al., 1993, Kolch, 2000). Activation and inhibition of Raf-1 activity via GPCRs has also been reported with the involvement of G protein $\beta\gamma$ subunits, phosphoinositide 3 kinase and Akt/protein kinase B, among other signaling entities (Slupsky et al., 1999, Kolch, 2000, Merighi et al., 2006).

Raf is a proto-oncogene that participates in regulating cell proliferation and differentiation (Kolch, 2000). The Ras/Raf/

MEK/ERK pathway constitutes a master regulator of growth control of great importance in health and disease, including malignant transformation, and it is a target for therapeutic intervention (Knight and Irving, 2014). Interestingly, Raf-1 is known to interact with a large variety of proteins including, receptors, G proteins, scaffolds/adaptors, cytoskeleton components, chaperones, kinases, and phosphatases, among others (Kolch, 2000). Raf-1 is localized within a large protein complex in its inactive state; activated Ras binds with high affinity Raf-1 and participates in its activation and localization within the cells (Kolch, 2000).

We did not observe a decrease in Raf-1 abundance in extracts from cells expressing $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenergic mutant receptors as compared to those expressing the ΔN mutant. Hence, a dysfunctional change rather than an alteration in the amount seems to be responsible of the observed actions.

It is worth noting that α_{1D} -adrenoceptors carboxyl terminus is particularly long (167 amino acids in the human orthologue; <http://www.uniprot.org/uniprot/P25100>). It is possible that its absence could leave intracellular domains exposed, which might directly or indirectly (i. e., through other molecular entities) interact with members of the MAP kinase pathway. At present, the α_{1D} -adrenoceptor crystal structure has not been resolved, and there is hardly any information on that of the carboxyl tails structures of GPCRs. Our current working hypothesis is that the absence of the α_{1D} -adrenoceptor carboxyl tail could lead to exposure of site(s) that might bind Raf-1 or associated proteins, preventing its phosphorylation and activation. By default, a role of the long α_{1D} -adrenoceptor tail could be to avoid exposure of such sites. Obviously, at the present time, this is just a hypothesis and experimental proof remains to be obtained. Analysis of in cellulo and in vitro interaction of MAP kinases and related scaffolding proteins with ΔN and $\Delta N\Delta C$ α_{1D} -adrenoceptors might help to support or discard this hypothesis. Similarly, analysis of pull-down proteins using receptor fragments as baits and yeast two-hybrid test system might give some clues. It is clear that more structural work is required to fully understand GPCR action.

It seems likely that the roles of the α_{1D} -adrenoceptor carboxyl tail extend beyond signaling and desensitization. It has been observed that a PDZ-interacting domain present in this tail associates with syntrophin (Chen et al., 2006); knockout of syntrophin isoforms results in the loss of α_{1D} -adrenergic action in aortic smooth muscle (Lyssand et al., 2008). This adrenoceptor subtype plays major roles in the regulation of blood pressure and in the pathogenesis of hypertension (Villalobos-Molina and Ibarra, 1996, Villalobos-Molina et al., 1999) a disease estimated to cause 4.5% of the total human disease burden (Whitworth, 2003). Knowledge on the functional domains of this receptor might help to better understand this disease and to design more effective therapeutic agents.

Acknowledgments This research was partially supported by grants from CONACyT [177556-253156] and DGAPA-UNAM [200812-200915]. JC was supported by the NIH (NS084398). Marco Antonio Alfonso is a student of the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM and the recipient of a fellowship from CONACyT; the present work constitutes a major part of his thesis. We express our gratitude to Dr. Rocío Alcántara-Hernández, Dr. Claudia Rivera, Dr. Héctor Malagón, Juan Barbosa, Aurey Galván, and Manuel Ortíz for technical help and advice.

References

- Breitman M, Kook S, Gimenez LE, Lizama BN, Palazzo MC, Gurevich EV, Gurevich VV (2012) Silent scaffolds: inhibition of c-Jun N-terminal kinase 3 activity in cell by dominant-negative arrestin-3 mutant. *J Biol Chem* 287:19653–19664
- Chen Z, Hague C, Hall RA, Minneman KP (2006) Syntrophins regulate α_{1D} -adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem* 281:12414–12420
- Diviani D, Lattion AL, Cotecchia S (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 272:28712–28719
- Fredriksson R, Schiöth HB (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 67:1414–1425
- García-Sáinz JA, Rodríguez-Pérez CE, Romero-Ávila MT (2004) Human α_{1D} adrenoceptor phosphorylation and desensitization. *Biochem Pharmacol* 67:1853–1858
- García-Sáinz JA, Romero-Ávila MT, Medina LC (2010) α_{1D} -adrenergic receptors constitutive activity and reduced expression at the plasma membrane. *Methods Enzymol* 484:109–125
- García-Sáinz JA, Vázquez-Cuevas FG, Romero-Ávila MT (2001) Phosphorylation and desensitization of α_{1D} -adrenergic receptors. *Biochem J* 353:603–610
- García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R (1999) α_{1} -adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* 30:449–458
- García-Sáinz JA, Villalobos-Molina R (2004) The elusive α_{1D} -adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles. *Eur J Pharmacol* 500:113–120
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
- Hague C, Chen Z, Pupo AS, Schulte NA, Toews ML, Minneman KP (2004) The N terminus of the human α_{1D} -adrenergic receptor prevents cell surface expression. *J Pharmacol Exp Ther* 309:388–397
- Harvey CD, Ehrhardt AG, Cellurale C, Zhong H, Yasuda R, Davis RJ, Svoboda K (2008) A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19264–19269
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR Jr (1995) International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of α_{1} -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* 47:267–270
- Keffel S, Alexandrov A, Goepel M, Michel MC (2000) α_{1} -adrenoceptor subtypes differentially couple to growth promotion and inhibition in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272:906–911
- Knight T, Irving JA (2014) Ras/Raf/MEK/ERK pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting. *Front Oncol* 4:160

- Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351(Pt 2): 289–305
- Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364:249–252
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lagerstrom MC, Schiöth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7:339–357
- Lattion AL, Diviani D, Cotecchia S (1994) Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 269:22887–22893
- Lefkowitz RJ (2013) A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 52:6366–6378
- Lyssand JS, Defino MC, Tang XB, Hertz AL, Feller DB, Wacker JL, Adams ME, Hague C (2008) Blood pressure is regulated by an {alpha}1D-adrenergic receptor/Dystrophin Signalosome. *J Biol Chem* 283:18792–18800
- McCune DF, Edelmann SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJ, Perez DM, Piascik MT (2000) Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol Pharmacol* 57:659–666
- Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, Baraldi PG, Borea PA (2006) Modulation of the Akt/Ras/Raf/MEK/ERK pathway by a(3) adenosine receptor. *Purinergic Signal* 2:627–632
- Okamura T, Antoun G, Keir ST, Friedman H, Bigner DD, Ali-Osman F (2015) Phosphorylation of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) by epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes formation of the GSTP1-c-Jun N-terminal kinase (JNK) complex and suppresses JNK downstream signaling and apoptosis in brain tumor cells. *J Biol Chem* 290:30866–30878
- Pérez-Aso M, Segura V, Monto F, Baretino D, Noguera MA, Milligan G, D'Ocon P (2013) The three alpha1-adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1833:2322–2333
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67:653–692
- Pupo AS, Uberti MA, Minneman KP (2003) N-terminal truncation of human alpha1D-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein. *Eur J Pharmacol* 462:1–8
- Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 9:373–386
- Rodríguez-Pérez CE, Romero-Ávila MT, Reyes-Cruz G, García-Sáinz JA (2009) Signaling properties of human alpha(1D)-adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: intrinsic activity, agonist-mediated activation, and desensitization. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 380:99–107
- Slupsky JR, Quittner U, Weber CK, Gierschik P, Lohse MJ, Rapp UR (1999) Binding of Gbetagamma subunits to cRaf1 downregulates G-protein-coupled receptor signalling. *Curr Biol* 9:971–974
- Vázquez-Prado J, Casas-González P, García-Sáinz JA (2003) G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal* 15:549–557
- Villalobos-Molina R, Ibarra M (1996) Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol* 298:257–263
- Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Ibarra M (1999) Functional evidence of alpha1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 126: 1534–1536
- Waldrop BA, Mastalerz D, Piascik MT, Post GR (2002) Alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat 1 fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 300:83–90
- Whitworth JA (2003) 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21:1983–1992
- Yang X, Zheng J, Xiong Y, Shen H, Sun L, Huang Y, Sun C, Li Y, He J (2010) Beta-2 adrenergic receptor mediated ERK activation is regulated by interaction with MAGI-3. *FEBS Lett* 584:2207–2212

Manuscrito en preparación:

Different phosphorylation patterns regulate α_{1D} -adrenoceptor signaling and desensitization.

Marco A. Alfonzo-Méndez, Gabriel Carmona-Rosas, Aurelio Hernández-Méndez, David

A. Hernández-Espinosa, M. Teresa Romero-Ávila and J. Adolfo García-Sáinz^a

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México. Ap. Postal 70-248, Ciudad de México, CP
04510. México.

^aTo whom correspondence should be addressed:

J. Adolfo García-Sáinz, MD, PhD

Inst. Fisiología Celular, UNAM

Ap. Postal 248

Ciudad de México, CP 04510

México

Email: agarcia@ifc.unam.mx

Abstract

Human α_{1D} -adrenoceptors (α_{1D} -ARs) are seven transmembrane-spanning proteins that mediate the actions of noradrenaline in homeostasis maintenance as well as the physiopathology of hypertension and benign prostatic hyperplasia. Although it is known that α_{1D} -AR is a phosphoprotein, its actual (specific) phosphorylation sites remain unknown. Using a combination of *in silico* analysis, mass spectrometry and site directed mutagenesis, we identified for the first time distinct phosphorylation patterns on α_{1D} -AR during noradrenaline or (and) non related agents-mediated desensitization. We found that the G protein coupled receptor kinase GRK2 and PKC α/β phosphorylate α_{1D} -AR during the latter processes. Phosphorylation on either receptor intracellular loop 3 or carboxyl tail was enough to regulate calcium desensitization signals. Whereas mutations on any of the mentioned domains altered mitogen activated protein kinases (MAPK) pathway and receptor internalization, suggesting a modular regulatory mechanism. Our data support the receptor phosphorylation bar code concept and provide new insights on the signaling outcomes and turn off relying on distinct phosphorylation patterns. Knowledge on α_{1D} -AR phosphorylation sites generated after different stimuli may unveil new strategies to avoid drug side effects during sustained administration.

Keywords: adrenergic receptors; α_{1D} -AR; mass spectrometry; phosphorylation, calcium signaling; ERK 1/2 signaling; internalization, desensitization.

¹*Abbreviations used:* α_{1D} -AR, α_{1D} -adrenergic receptor, ERK, extracellular signal-regulated kinase; NA, noradrenaline; PMA, phorbol 12-myristate, 13-acetate; PKC, protein kinase C; GRK, G protein coupled kinase, IL3, intracellular loop 3; EGFP, enhanced green fluorescent protein.



Review

Novel Structural Approaches to Study GPCR Regulation

Marco A. Alfonzo-Méndez, Rocío Alcántara-Hernández and J. Adolfo García-Sáinz *

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico; malfme@gmail.com (M.A.A.-M.); ralcanta@ifc.unam.mx (R.A.-H.)

* Correspondence: agarcia@ifc.unam.mx; Tel.: +52-55-5622-5613

Academic Editor: Kathleen Van Craenenbroeck

Received: 4 November 2016; Accepted: 21 December 2016; Published: 23 December 2016

Abstract: Background: Upon natural agonist or pharmacological stimulation, G protein-coupled receptors (GPCRs) are subjected to posttranslational modifications, such as phosphorylation and ubiquitination. These posttranslational modifications allow protein–protein interactions that turn off and/or switch receptor signaling as well as trigger receptor internalization, recycling or degradation, among other responses. Characterization of these processes is essential to unravel the function and regulation of GPCR. Methods: In silico analysis and methods such as mass spectrometry have emerged as novel powerful tools. Both approaches have allowed proteomic studies to detect not only GPCR posttranslational modifications and receptor association with other signaling macromolecules but also to assess receptor conformational dynamics after ligand (agonist/antagonist) association. Results: this review aims to provide insights into some of these methodologies and to highlight how their use is enhancing our comprehension of GPCR function. We present an overview using data from different laboratories (including our own), particularly focusing on free fatty acid receptor 4 (FFA4) (previously known as GPR120) and α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors. From our perspective, these studies contribute to the understanding of GPCR regulation and will help to design better therapeutic agents.

Keywords: G protein-coupled receptors (GPCRs); posttranslational modifications; phosphorylation; ubiquitination; mass spectrometry (MS); GPR120; FFA4; α_1 -adrenoceptors; protein–protein interactions

1. Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) are the largest family of membrane proteins, comprising as many as 3%–5% of the genes encoding proteins in sequenced genomes [1,2]. A hallmark of GPCRs is their ability to interact with a large variety of chemically diverse ligands. For this reason, GPCRs mediate key physiological processes, ranging from vision and olfaction to signaling in diverse organs and systems, such as the central nervous system, endocrine and immune networks, respiratory and digestive tracks, and many others. Thus, it is not an overstatement to say that this family of receptors participates in all of the major functions of vertebrates. This family of receptors is also involved in many human diseases, including heart failure, hypertension, diabetes, prostate cancer and bronchial asthma, to mention a few [3]. It is estimated that 30%–40% of drugs prescribed to treat these diseases target GPCRs [4] and, due to the large number of orphan receptors and tools for pharmacological screening, this number will probably increase [5]. It is currently estimated that approximately 800 human GPCR sequences exist, and they have been classified on the basis of their ligand-binding characteristics, signaling and sequence. Indeed, Fredriksson et al. [1] classified human GPCR sequences into five main families: Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/taste2, and Secretin.

GPCRs are also denominated as seven transmembrane domain receptors due to their characteristic structure of an extracellular amino terminus, an intracellular carboxyl terminus and seven membrane-spanning segments connected by intra- and extracellular loops [6,7]. Seven transmembrane receptors usually transduce their signals by coupling to heterotrimeric G proteins that modulate the activity of enzymes (such as adenylyl cyclase or phospholipase C) and ion channels. These effectors increase or reduce the concentrations of second messengers (cyclic AMP, IP₃, diacylglycerol, calcium, etc.) modulating enzymes, such as protein kinases, to further propagate signals within the cell. Furthermore, there is also evidence indicating that β -arrestins participate in GPCR signaling [4].

Upon activation, GPCRs undergo conformational changes that induce interactions between their intracellular domains and downstream signaling molecules, such as G protein subunits and β -arrestins [4,7,8]. GPCR posttranslational modifications (PTMs) include phosphorylation, palmitoylation, acetylation, glycosylation and ubiquitination, among others. Such covalent changes seem to play roles in the signaling and regulation of GPCRs [9–12]. GPCRs are frequently glycosylated at the amino terminus facing outside the cell, whereas the intracellular carboxyl tail is a substrate for phosphorylation, palmitoylation and ubiquitination. Among these PTMs, phosphorylation seems to be a key player in determining receptor desensitization/resensitization cycles [10], while ubiquitination is associated with lysosomal sorting and degradation [13,14].

The physiological or pathological outcome of GPCR-mediated signaling depends on the molecules with which the receptors interact. Actually, the PTMs mentioned above can induce tertiary and quaternary protein structural changes that regulate receptors association to other molecules and their function [15,16]. Therefore, to understand receptor signaling and regulation and to design rational GPCR-targeted drugs, it is necessary to characterize the conformational and structural receptor dynamics, as well as the specific GPCR interactome.

X-ray crystallography is the gold standard for investigating the structures of proteins and higher-order protein complexes at atomic resolution. After a gap from the first solved rhodopsin receptor crystal structure [17], 20 structures from the Rhodopsin family, two from the Secretin family, two from the Glutamate family and one Frizzled GPCR structure have been reported to date (see [18–21] and the references therein). The Nobel Prize in Chemistry was awarded to Robert Lefkowitz and Brian Kobilka in 2012 for their contribution to knowledge on the function and structure of β -adrenergic receptors [4,7].

Despite these great achievements, studies dealing with GPCR crystal structures remain challenging because it is very difficult to express and purify a sufficient quantity of any GPCR in an intact and functionally active form for direct experimental definition of its structural properties and binding interactions [22]. X-ray crystallography also has limitations, such as difficulties in monitoring protein dynamics [23]. Thus, there is only one crystal structure of a signaling complex available, i.e., the β_2 adrenoceptor/Gs complex [24]. Although the crystal structure of β -arrestin-1 in complex with a phosphorylated V2 vasopressin receptor carboxyl-terminal peptide has already been reported [25], no crystal structure of a GPCR subjected to PTMs has been reported yet. This makes it hard to characterize the signaling structure/function mechanism of GPCRs. For these reasons, it seems necessary to complement studies on GPCR structures with post-translational modifications and associated molecules using other methods.

Mass spectrometry (MS) is useful not only for identifying protein sequences [25] but also for examining their structures after PTMs, folding and dynamics [26,27]. After important improvements on MS methodology, this technique has emerged as an important addition to X-ray crystallography and has been used in studies of protein structure and dynamics. Moreover, MS experiments require a small amount of sample, have no mass limits, allow rapid processing and can be used in high-throughput analysis [28–30]. The aim of this review is to present how MS-based studies are contributing to our knowledge on GPCR posttranslational modifications, associated proteins and receptor function/structure.

2. Posttranslational Modifications of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs)

PTMs are a series of processes that can vary among cells, depending on the repertoire of proteins expressed, whose functional repercussion can also be affected by different cell stimuli and conditions, which affect protein abundance, trafficking, cell location and stability [31–33]. Currently, 469 different PTMs are reported in the UniProt database (<http://www.uniprot.org/>): 326 in eukaryotes, 250 in bacteria, 80 in archaea, and more than 100 in *Homo sapiens*. According to PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/>) [34], protein phosphorylation is the most common PTM and has been detected in approximately 17,500 proteins of the human proteome. Frequent modifications include ubiquitination (approximately 8100 proteins), lysine acetylation (approximately 6700 proteins), lysine methylation (approximately 2400 proteins) and glycosylation (approximately 4500 proteins). The less frequently reported PTMs include succinylation, SUMOylation, citrullination, neddylation, disulfide bonding and lipidation [35]. Importantly, >95% of these data have been derived from MS-based proteome studies. Some advances on the most studied PTM, phosphorylation, with reference to a closely associated PTM (ubiquitination), are subsequently presented.

2.1. Phosphorylation

The phosphorylation state of a given protein is the result of the activity of two groups of enzymes: protein kinases and protein phosphatases. Protein kinases are phosphotransferases that transfer the γ phosphate group from ATP into serine, threonine or tyrosine amino acid residues, whereas phosphatases are hydrolases that release phosphate groups from those residues. Many GPCRs are subject to phosphorylation, and there is evidence suggesting that this PTM is associated with receptor desensitization and intracellular trafficking [9,32,36,37]. Furthermore, evidence also exists for phosphorylation-independent attenuation of signaling [38]. GPCR phosphorylation can take place at tyrosine residues (see for example [39,40]); however, serine/threonine phosphorylation is much more common and has been more extensively studied. This observation likely reflects that serine/threonine protein kinases are among the main modulators of these receptors. Currently, it is indicated that in homologous desensitization (agonist-dependent response-attenuation), G protein-coupled-receptor kinases (GRKs) are the major players. However, in heterologous desensitization (receptor activation-independent signaling-attenuation), second messenger-dependent protein kinases, such as protein kinase C and protein kinase A, and other protein kinases are the major players [10]. However, it seems to be an oversimplification to attribute all receptor phosphorylation that takes place during homologous desensitization to the action of GRKs; see, for example, the role of EGF transactivation in α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation induced by noradrenaline [41].

GPCR phosphorylation seems to be required for appropriate association with β -arrestins, and a phosphate sensor has been suggested in β -arrestin-1 on the basis of functional and crystallographic data [25]. It is interesting that multiple phosphorylation sites exist in most GPCRs and that they are mainly located at their carboxyl termini and third intracellular loops. Experimental evidence has shown that different phosphorylation patterns exist on GPCRs, depending on what ligand activates them and the cell in which they are expressed on; such “phosphorylation codes” can determine receptor function [31,32,37,42]. Different patterns of GPCR phosphorylation exist in a cell-specific manner also with different ligands (total agonist, partial agonist or inverse agonist), which can differentially regulate such phosphorylation patterns. Interestingly, this can lead to preferential signaling towards one action rather than others, a phenomenon known as biased stimulation [31,32,37,42]. The possibility that PTMs might determine the pharmacodynamic behavior of ligands is a current area of intense research.

As already indicated, GPCR phosphorylation at the carboxyl terminus and intracellular loops leads to β -arrestin association and receptor uncoupling from cognate G proteins. This represents a switch from G protein mediated- to β -arrestin-mediated-signaling. β -Arrestins modulate numerous pathways, primarily through recruitment of β -arrestin adaptor proteins [43]. These include the clathrin adaptor AP2, NSF (Nethylmaleimide-sensitive fusion protein, an ATPase involved in membrane

fusion), ARF6 (ADP-ribosylation factor 6, a small G protein involved in vesicular traffic which participate in GPCR endocytosis) and also kinases of the mitogen activated protein kinase pathway [43].

Phosphorylation site prediction by in silico analysis is also a very useful tool. Advances in bioinformatics have allowed frequent confirmation of predictions by in cellulo experiments. The quantitative MS-based approach, with its high sensitivity and specificity, and mutational analysis are being increasingly applied in protein phosphorylation analysis, including phosphorylation sites in GPCRs, overcoming the limitations of conventional approaches, such as sequence motif analysis and site-directed mutagenesis [44,45]. Through tandem affinity purification and MS, the amino acid sequence and phosphorylation sites can be determined simultaneously and unequivocally. Many GPCRs are known to be phosphoproteins. However, only in a limited amount of cases have agonist-induced and heterologous desensitization-associated GPCR phosphorylation been studied by MS in cellulo. This is rapidly changing since more groups are using this approach, and it is very likely that much more information will be available within a few years. A non-comprehensive list of GPCRs that have been studied using MS is presented in Table 1. In many cases, functional consequences have been suggested on the basis of a series of consistent evidences; in others, site-directed mutagenesis studies have been used to support such possibilities.

Table 1. G protein-coupled receptor (GPCR) studied using mass spectrometry. Amino acids in red indicate phosphorylation sites. Domain (DOM), carboxyl-terminus (C-term), third intracellular loop (3IL), references (Ref.).

GPCR	Main Phospho-Peptides Identified by MS	DOM	Functional Role	Ref.
Rhodopsin	DDDAS ³³⁴ ATASKTE DDDASATAS ³³⁸ KTE	C-term C-term	Inactivation	[46]
Rhodopsin	DDDAS ³³⁴ ATASKTE DDDASATAS ³³⁸ KTE DDDASATASKTETS ³⁴³ QVAPA	C-term C-term C-term	Inactivation	[47]
β_2 -Adrenergic	LPGT ³⁸⁴ EDFVGHQGT ³⁹³ VPS ³⁹⁶ DNIDS ⁴⁰¹ QGRNCS ⁴⁰⁷ T ⁴⁰⁸ ND LPGT ³⁸⁴ EDFVGHQGT ³⁹³ VPS ³⁹⁶ DNIDS ⁴⁰¹ QGRNCS ⁴⁰⁷ T ⁴⁰⁸ ND S ⁴¹¹ LLDLPGT ³⁸⁴ EDFVGHQGT ³⁹³ VPS ³⁹⁶ DNIDS ⁴⁰¹ QGRNCS ⁴⁰⁷ T ⁴⁰⁸ ND	C-term C-term C-term	In vitro phosphorylation. Desensitization	[48]
β_2 -Adrenergic	FHVQNLS ²⁴⁶ QVEQDGR RS ²⁶¹ SKFCLKE RSS ²⁶² KFCLKE AYGNYS ³⁵⁵ NGNTGEQSGYHVEQEK AYGNYS ³⁵⁶ NGNTGEQSGYHVEQEK LLCEDLPGTEDFVGHQGTVPDND ⁴⁰¹ QGR	3IL 3IL 3IL C-term C-term C-term	Desensitization	[49,50]
V2-vasopressin	TGS ²⁵⁵ PGEGAHVSAAVAK	3IL	Not suggested	[51]
CXCR4	ALTSVSRGS ³²³ S ³²⁴ LKIL	C-term	Desensitization Internalization Signaling	[52]
Muscarinic M3	PS ³⁸⁴ SDNLQVPD QAQKS ⁴¹² MDDR QS ⁵⁷⁷ VIFHK	3IL 3IL C-term	Signaling	[31]
Dopamine 2	HGLHSTPDS ³²¹ PAKPEK	3IL	Desensitization Internalization	[53]
GPR120/FFA4	GAILT ³⁴⁷ DTS ³⁵⁰ VKR GAILTDT ³⁴⁹ S ³⁵⁰ VKR RNDLS ³⁵⁷ IISGYDVPDYA	C-term C-term C-term	Desensitization and Recruitment of arrestin 3	[42]
Apelin (APJ)	SAS ³⁴⁵ YSSGHSQGPGPNMGK SASYSS ³⁴⁸ GHSQGPGPNMGK	C-term C-term	Biased signaling	[54]

Table 1. Cont.

GPCR	Main Phospho-Peptides Identified by MS	DOM	Functional Role	Ref.
Neuropeptide FF2 (NPFF2)	AKS ³⁶⁹ HVLINT ³⁷⁵ S ³⁷⁶ NQLVQESTFQNPHGGETLLYR KS ³⁹⁸ AEKQQELVMEEK ETTNS ⁴¹⁸ EIESAMVSK	C-term C-term C-term	Desensitization	[55]
μ -Opioid	EFCIPTSSSTIEQQNS ³⁶³ AR EHPS ³⁷⁵ TANTVDR QNT ³⁷⁰ REHPSTANTVDR	C-term C-term C-term	Internalization	[44]
κ -Opioid	RQS ³⁵⁶ T ³⁵⁷ NRVRNTVQDPASMRDVGGMNKPVTHHHHHR EHPS ³⁷⁵ TANTVDR QNT ³⁷⁰ REHPSTANTVDR	C-term C-term C-term	Internalization	[56]
κ -Opioid	RQS ³⁵⁶ T ³⁵⁷ NRVRNTVQDPASMRDVGGMNKPVTHHHHHR QSTNRVRNT ³⁶³ VQDPAS ³⁶⁹ MRD	C-term C-term	Internalization	[56]
Parathyroid hormone receptor 1 (PTH1R)	S ⁴⁷³ WSRWTLALDKR SGS ⁴⁹¹ SSYSYGPMVSHTSVTNVGPR SGSS ⁴⁹² S ⁴⁹³ YSYGPMVSHTSVTNVGPR SGSSYSYGPMVSHT ⁵⁰³ S ⁵⁰⁴ VTNVGPR VGLGLPLS ⁵¹⁸ PR PGTPALET ⁵⁴⁸ LETPPAMAAPK PGTPALETLETT ⁵⁵² PPAMAAPK	C-term C-term C-term C-term C-term C-term C-term	Interaction with β -arrestins	[57]
Growth hormone secretagogue receptor (GHSR1)	KLS ³⁴⁹ T ³⁵⁰ LKDESSR AWTES ³⁶² SINT ³⁶⁶ AWTESS ³⁶³ INT ³⁶⁶	C-term C-term C-term	Endocytosis and recruitment of β -arrestins	[58]

2.2. Ubiquitination

Ubiquitination is the second most frequently studied PTM in GPCRs. Ubiquitination of GPCRs and ubiquitination of adaptor proteins have been shown to regulate the GPCR endocytic pathway or GPCR trafficking [59,60]. Ubiquitin is a polypeptide of 76 amino acids residues (~8.5 kDa) that when attached to GPCRs promote receptor sorting into degradative pathways, typically on early to late endosomes or maturing vesicular bodies. Receptor proteolysis leads to a decrease in the total number of GPCRs available for signaling, a process known as “down-regulation”, which forms a part of long-term signaling attenuation (reviewed in [61], see also the references therein).

Ubiquitination is carried out by an enzymatic cascade involving the sequential activity of three ligases: E1, E2 and E3. Through their action, ubiquitin moieties are covalently and reversibly attached to protein substrates, mainly on the ϵ -amino groups of internal lysines or, less frequently, on the free amino group at the amino-terminus of substrates [59]. E3 ubiquitin ligases have been shown to interact with GPCRs either directly through non-canonical WW-domain-mediated interactions or indirectly through interactions involving adaptor proteins. Many GPCRs seem to be degraded by metallo-proteinases present in lysosomes. However, before this take place, the ubiquitin moieties are removed by ubiquitin-specific peptidases (named USPs) ([61] and the references therein). Interestingly, removal of the GPCR ubiquitin moiety by peptidases is also involved in recycling GPCRs to the cell-surface for resensitization [61].

Ubiquitination of ~40 different GPCRs has been reported and among the best studied, is the β_2 -adrenoceptor. Agonist-activation of this receptor leads to very rapid phosphorylation, followed by ubiquitination; this latter PTM decreases hours later, correlating with receptor degradation [62]. Using MS, the ubiquitinated sites have been mapped at K²⁶³ and K²⁷⁰, in the third intracellular loop, and at K³⁴⁸, K³⁷² and K³⁷⁵, in the carboxyl terminus [63]. β_2 -Adrenoceptors, in which lysines were mutated, internalize into endosomes upon agonist-activation but are not degraded in the lysosomes [63,64]. In contrast, β_2 -adrenoceptors in which phosphorylation sites were mutated exhibited impaired ubiquitination as well as reduced β -arrestin interaction [62]. Therefore, agonist-stimulated β_2 -adrenoceptor ubiquitination requires prior receptor phosphorylation and β -arrestin binding [62,65]. Interestingly, carvedilol, a β -adrenergic “antagonist”, frequently used in medical practice for the treatment of cardiovascular diseases, induces β_2 -adrenoceptor-dependent β -arrestin signaling, receptor ubiquitination, internalization, endosomal trafficking, and degradation [65]. The action of carvedilol seems to take place through a

different molecular processes [66]. The pharmacodynamic classification of drugs acting on GPCRs is becoming much more complex (i.e., agonist/antagonist, inverse agonists/biased agonist/allosteric modulators) [67–69] but also opening new paths for therapeutic intervention.

A similar case exists for fingolimod, an S1P₁ receptor (agonist but functional antagonist) that induces rapid receptor phosphorylation, ubiquitination, internalization and degradation [70]. Down-regulation of S1P₁ receptor seems to play a key role in lymphocyte migration [71] and astrocyte activation [72]. These actions seem to explain why this agent has found a therapeutic niche in the treatment of multiple sclerosis [73].

An excellent comprehensive review on ubiquitination/deubiquitination of GPCRs was recently published and readers are referred to this [65].

3. Mass Spectrometry

MS is becoming a key technique to identify and properly characterize protein PTMs, including phosphorylation, ubiquitination, glycosylation, and proteolytic cleavage, among others. This highly specialized technique allows researchers to obtain the amino acid sequences that are modified. With this key information, bioinformatic analysis can be performed to obtain predictions on the structural consequences of such modifications as well as the putative enzymes responsible, and experiments can be designed to test the PTM functional consequences and relevance of putative participants in these processes. Practically, MS is very important because it can allow critical information to be obtained within a reasonable time frame and with high sensitivity [74,75].

MS requires three basic steps: (1) sample preparation, which includes obtaining a GPCR sample in sufficient quantity (usually to be detectable in Coomassie blue-stained gels) and of reasonable purity, as well as its proteolysis products under carefully controlled conditions; (2) sample ionization and detection, which involves sample bombing with electrons, fragmentation and ion formation, separation of the components according to their mass-to-charge ratio and detection by the mass spectrometer; and (3) analysis of sample data.

Researchers working in the GPCR field, including our group, are frequently only marginally familiar with MS techniques. Although MS systems are becoming more common, as a part of the equipment present in academic facilities, the spectrometer's sensitivity and the expertise of the scientist in charge of it remain critical. In our case, it has been essential to interact with scientists who specialize in MS in academic service units, while the use of qualified commercial services is also an option.

Like essentially all techniques, MS offers advantages and disadvantages. As indicated, its main advantage is the possibility of processing samples and obtaining reliable data within reasonable time frames. However, its disadvantages include its limited sensitivity to proteases and difficulty of sample ionization. The presence of contaminants in this high-sensitive assay can lead to misleading results. Simple MS is not quantitative, but quantitative data can be obtained through the use of heavy and light isotopes during cell culture, called isotope-coded affinity tag labeling [76]. In the case of GPCRs, the highly hydrophobic nature of their transmembrane domains remains a challenge. During the past decade, MS analysis has gained interest for elucidating protein–protein and ligand–protein interactions, validating interactions by double hybrid assays, co-immunoprecipitation assays and Western blot analysis. These different techniques together with advances in confocal microscopy, FRET (Förster resonance energy transfer)/BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) and image analysis have greatly contributed to identification of cellular complexes and “interactomes”.

4. Tales of Three GPCRs

In the following subsections, we present some examples of what these new technologies have taught us. In the first case study, we present some recent advances on free fatty acid receptor 4 including its regulation by phosphorylation, identification and characterization of its phosphorylation sites, and their possible functional relevance. In the second case study, findings on proteins that associate and/or co-purify with α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors and their possible relevance are presented. In these

two subsections, the main emphasis is made on aspects that have already been published by different groups, and we are incorporating some findings from our laboratory that have not yet been disclosed and might be of interest to other groups working with these of other GPCRs.

4.1. Free Fatty Acid Receptor 4 (FFA4) Phosphorylation Sites

Free fatty acids are important metabolic fuels by themselves and are constituents of storage lipids, such as triglycerides and membrane lipids, including phospholipids and sphingolipids. In addition to these well-known biochemical roles, they exert functions as natural agonists for some nuclear receptors [77] and for a family of GPCRs, comprising four members: FFA1-FFA4, with differential affinity for distinct fatty acids [78]. FFA4 (previously known as GPR120) was deorphanized in 2005 [79], and it is abundantly expressed in the intestine, where it induces GLP-1 (glucagon-like peptide-1) release into the circulation, which modulates insulin secretion and participates in glucose homeostasis. Additional studies showed that FFA4-deficient mice develop obesity, glucose intolerance and a fatty liver. Furthermore, a dysfunctional variant of this receptor is associated with obesity and other metabolic disturbances in humans [80]. In addition, FFA4 activation induces insulin sensitization and anti-inflammatory effects [81], as well as a variety of other actions in different organs and tissues [78,82]. Our group and others have observed that FFA4 is a phosphoprotein whose phosphorylation state is modulated by agonists and activation of protein kinase C [42,83–86]. Unsurprisingly, agonist-induced phosphorylation does not seem to be mainly mediated by protein kinase C, but rather by other kinases, likely GRKs [83,85]. Agonist- and protein kinase C-mediated FFA4 phosphorylation seem to be associated with receptor internalization [83,86]. Our group was working on determining the phosphorylation sites using MS when a very elegant paper, employing MS, reported the FFA4 phosphorylation sites located at the carboxyl terminus and their importance, together with some acidic residues (E³⁴¹, D³⁴⁸, and D³⁵⁵), in the receptor association with β -arrestin-2 (also known as arrestin-3) [42]. Using a mutagenesis approach, other group also reported some FFA4 phosphorylation sites located at the FFA4 carboxyl terminus [85]. In Table 2, the identified phosphorylated residues and the techniques employed are presented. Phosphorylation site predictions were obtained using the Group Based Prediction System (GPS algorithm 2.1 v) [87,88]. Further work has shown that these residues alter different aspects of receptor function [86]; thus, mutation to alanine of S357 and S361 (named cluster 2) markedly altered receptor internalization and arrestin 3 recruitment, whereas similar mutations of T³⁴⁷, T³⁴⁹ and S³⁵⁰ (cluster 1) had no effect on receptor internalization and had minor effect on arrestin 3 recruitment, but markedly altered FFA4-mediated Akt activation [86]. Interestingly, in a recent review of this receptor, it was shown that these phosphorylation sites are conserved in human, rat and mouse FFA4 orthologs [89].

It is important to mention that truncation of the full C-terminal tail did not restrict activation of heterotrimeric G proteins [42], which allows molecular distinction between G protein-mediated and arrestin-mediated signaling. This raises the possibility of ligand development for selective activation of one of these signaling pathways over the other. This is important considering the physiological roles of this receptor in metabolic syndrome, diabetes, adipose tissue development and inflammation [80–82,90]. We also show in Table 2 that there are putative phosphorylation sites not only in the carboxyl terminus but also in the third intracellular loop as predicted using the GPS algorithm [87,88] and also several suggested in a previous study [89]. MS data obtained by our group indicated that T²⁴² is a phosphorylation site. At this point, the functional significance of this site remains to be determined (work in progress in our laboratory).

Table 2. FFA4 receptor phosphorylation sites. Amino acids in red indicate phosphorylation sites; references (Ref.).

FFA4 Receptor Carboxyl Tail Sequence	Technique	Ref.
CRNEWKKIFCCFWFPEKGAILT ³⁴⁷ DT ³⁴⁹ S ³⁵⁰ VKRNDLS ³⁵⁷ IIS ³⁶⁰ G	In silico	[87,88]
CRNEWKKIFCCFWFPEKGAILT ³⁴⁷ DTS ³⁵⁰ VKRNDLS ³⁵⁷ IISG	Mutagenesis	[85]
CRNEWKKIFCCFWFPEKGAILT ³⁴⁷ DT ³⁴⁹ S ³⁵⁰ VKRNDLS ³⁵⁷ II SG	MS	[42]
CRNEWKKIFCCFWFPEKGAILT ³⁴⁷ DT ³⁴⁹ S ³⁵⁰ VKRNDLS ³⁵⁷ IIS ³⁶⁰ G	MS	[86]
CRNEWKKIFCCFWFPEKGAILTDT ³⁵⁰ VKRNDLS ³⁵⁷ IIS ³⁶⁰ G	MS	Our data
FFA4 Receptor Intracellular Loop 3 Sequence	Technique	Ref.
S ²²⁶ YS ²²⁸ KILQITKAS ²³⁷ RKRLT ²⁴² VSLAYSES ²⁵⁰ HQIRVS ²⁵⁶ QQDFRLFRT ²⁶⁵ LFL	In silico GPS	[87,88]
YSKILQITKAS ²³⁷ RKRLT ²⁴² VSLAYSESHQIRVS ²⁵⁶ QQDFRLFRTLFL	In silico	[89]
YSKILQITKASRKRLT ²⁴² VSLAYSEHQIRVSQQDFRLFRTLFL	MS	Our data

4.2. α_1 -Adrenoceptor Associated Proteins

α_1 -Adrenoceptors belong to a three-member (α_{1A} , α_{1B} , and α_{1D} subtypes) subfamily of GPCRs that mediate the actions of adrenaline and noradrenaline [90]. This receptor subfamily participates in many physiological actions of catecholamines (regulation of blood pressure, urogenital functions, intermediary metabolism, among many others) and in the physiopathology of some diseases (hypertension, benign prostatic hyperplasia, among others) [91]. It is well-known that these adrenoceptors are phosphoproteins whose phosphorylation state is modulated by GRKs and protein kinase C and that their phosphorylation is associated with desensitization and internalization [9,92–105]. The elegant pioneering work of Cotecchia and coworkers identified, by site-directed mutagenesis, the GRK- and protein kinase C-target sites at the carboxyl terminus of α_{1B} -adrenoceptors [99–101]. The phosphorylation sites in the other two α_1 -adrenoceptors have not yet been identified.

During our work on α_{1A} -adrenoceptors using immunopurification and MS, we observed that an important number of proteins associate during the purification steps with this adrenoceptor, which were clearly and consistently observed in the different analyses performed. Some of these proteins are listed in Table 3. These include proteins involved in cell signaling, vesicular trafficking and degradation pathways, among others. It is clear that co-purification and detection by MS only suggests, but does not probe, direct or indirect (i.e., through the formation of mega-complexes or signalosomes) interactions with the GPCR of interest or play a role on signaling or regulation. However, published functional data are consistent with such possible interactions and might be provocative enough to be explored by different experimental approaches.

MS analysis suggested the possible interaction of α_{1A} -adrenoceptors with enzymes and adaptor proteins previously reported as elements that participate in the regulation of this receptor subtype (phosphorylation/desensitization/internalization). This includes protein kinase C isoforms, such as protein kinase C α [106] and δ [107]. Surprisingly, the atypical isoform ζ was also detected. Other elements include subunits of phosphoinositide 3-kinase, which is known to participate in α_{1A} -adrenoceptor phosphorylation and heterologous desensitization induced by okadaic acid and phorbol esters, as well as to co-immunoprecipitate with the adrenoceptor. Additionally, the regulatory subunit δ isoform of PP2A was also observed via MS of immuno-purified α_{1A} -adrenoceptors.

Proteins, such as clathrin, dynamin, and Rabs, that participate in the internalization and trafficking of GPCRs have been identified as common members of GPCRs-complexes. In our MS studies, clathrin heavy chain, dynamin 2 and dynamin like-protein 1 were observed to be proteins that co-purify with α_{1A} -adrenoceptors. It has been demonstrated that α_{1A} -adrenoceptors co-localize with nuclear membrane protein lamina-associated protein 2 in adult cardiac myocytes, and it has been suggested to activate signaling at the nucleus [108] in our MS studies the presence of lamina 1 and lamina 2, exportins, and importins (Table 3).

Others proteins that were identified were members of the mitogen activated protein kinase family; myosin light-chain kinase; cytoskeletal proteins, such as actin, tubulin and myosin; and diverse elements of the degradation machinery, such as ubiquitin-protein ligase E3 and SUMO-activating enzyme subunit 2, among others (Table 3).

Differences in agonist-induced α_{1A} -adrenoceptor phosphorylation, desensitization and internalization have been observed when the action of phenylethylamine agonists (such as phenylephrine and noradrenaline) were compared to imidazolines (such as oxymetazoline) [106]. The low-efficacy agonist, oxymetazoline, induces G protein-coupled receptor kinase-dependent α_{1A} -adrenoceptor phosphorylation and it is followed by rapid desensitization and receptor internalization [106]. In contrast, phosphorylation of these receptors in response to noradrenaline largely depends on protein kinase C activity, it is not followed by clear desensitization, and the receptors undergo delayed internalization [106]. Loss of response after drug exposure is a particular problem for the vasoconstrictor effects of medications containing oxymetazoline. α_{1A} -Adrenoceptor activation seems to play a key role in development of benign prostatic hypertrophy and treatment with selective antagonists seem to be of great help, ameliorating urinary symptoms [109]. Antagonists that could induce receptor internalization/down-regulation could be of potential therapeutic use. Understanding the receptor's PTM that take place under the action of different agents, and their cellular consequences might be of help in developing of more effective drugs with fewer undesirable effects.

Table 3. Protein detected MS of immunopurified α_{1A} -adrenoceptors. PKC, protein kinase C; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PP2A, protein phosphatase 2A; STAT, signal transducer and activator of transcription.

Detected Protein	Function	Possible Role
PKC α , δ and ζ	Serine/threonine protein kinase	Desensitization
PI3K	Phosphoinositide-dependent protein kinase	Desensitization
PP2A	Serine/threonine protein phosphatase	Resensitization
Dynamitin 2	Scission of newly formed vesicles from de plasma membrane	Internalization
Clathrin	Formation of coated vesicles	Internalization
STAT1 and 3	Signal transducer and activator of transcription	Unknown
MAD2 and 4	TGF- β action, transcription factor	Unknown
Rab3	Membrane traffic	Vesicular traffic
Ubiquitin protein ligase E3	Ubiquitin ligase	Degradation
SUMO-activating enzyme subunit 2	E1-ligase for SUMO1/2/3	Degradation
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	E3 ubiquitin ligase complexes	Degradation
Exportin-1	Nuclear export of proteins	Unknown
Exportin-2	Nuclear export of proteins	Unknown
Importin-7	Prevents activation of Ran-GTPase	Unknown
Lamina B1	Nuclear structure and dynamics	Nuclear association
Lamina-associated polypeptide 2	Assembly of the nuclear lamina/nuclear organization	Nuclear association
Myosin	ATP-dependent motor protein	Unknown

α_{1D} -Adrenoceptors play a major role in the control of blood pressure and in the pathogenesis of hypertension [110–113]. It has been observed that this receptor subtype exhibits intrinsic activity of functional importance [96,114–118]. This subtype has been particularly difficult to study. When expressed, it exhibits a predominant intracellular location [119], which seems be due to a domain located at the amino terminus [120–122]; therefore, amino terminus truncation is a suitable experimental procedure to achieve α_{1D} -adrenoceptor expression at the plasma membrane [96,114,120–122]. Interestingly, recent detailed work has shown, using receptor affinity purification and MS, that in multiple human cell lines, α_{1D} -adrenoceptors are expressed both as the full-length form and also as an amino terminus-truncated protein [123]. A cleavage site was identified at the L910/V91 site, and it was suggested that the proteolytic processing of the amino terminus is a physiological mechanism to achieve membrane location of α_{1D} -adrenoceptors with optimal functional properties [123].

Hague and coworkers [124,125] have shown that the α_{1D} -adrenoceptor carboxyl terminus associates through a PDZ-interacting motif with syntrophins, which increases receptor expression and stability. The dystrophin proteins, syntrophin, dystrobrevin, and utrophin, were identified as α_{1D} -adrenoceptor-interacting proteins [125]. MS analysis of purified α_{1D} -adrenoceptors evidenced these and other associated proteins (Table 4). In our experiments using MS of immuno-purified α_{1D} -adrenoceptors, a series of dynamin and many nuclear proteins were observed; however, in most cases, their possible roles in the receptor's signaling and regulation are unknown (Table 4).

Table 4. Protein detected MS of immuno-purified α_{1D} -adrenoceptors. * Data from [125]; ** our data.

Protein	Function	Possible Role
* SNTB Syntrophin, β 1 and 2	Actin-binding protein	Adaptor protein
* UTRN Utrophin	Component of cytoskeleton	Adaptor protein
* ERLIN 2 ER lipid raft associated 2	Endoplasmic reticulum-associated degradation	Unknown
* GOPC	Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing	Adaptor protein
* ERLIN 1	Endoplasmic reticulum-associated degradation	Unknown
* DTNA, Dystrobrevin α	Cytoplasmic proteins bind to syntrophin	Adaptor protein
* SNTA1, Syntrophin α 1	Actin-binding protein, protein associated with dystrophin	Adaptor protein
* ACTA	Actin α 2 smooth muscle aorta	Cell motility
* AMFR	Autocrine motility factor receptor	Membrane traffic
* CKAP4	Cytoskeleton-associated protein	Cell motility
** OPA1	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	Unknown
** DNAM2	Dynamin-2	Scission of newly formed vesicles
** EEF2	Elongation factor 2	Unknown
** CSE1L, XPO1, XPO7	Exportin 1, 2 and 7	Unknown
** XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	Unknown
** MTHFD1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	Unknown
** UBA2	SUMO-activating enzyme subunit 2	Unknown
** NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93	Unknown
** DDX21	Nucleolar RNA helicase 2	Unknown
** MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	Unknown

5. Perspectives

MS has emerged as a powerful complementary structural tool that complements information gained through X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance, which both provide high resolution three-dimensional structural information for GPCRs and GPCR complexes. MS is a sensitive tool for identifying GPCR PTMs (phosphorylation and ubiquitination). It can be easily anticipated that the number of GPCRs whose PTMs will be determined in the very near future will markedly increase. These approaches together with the use of fluorescent confocal microscopy, FRET (Förster resonance energy transfer) and BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) provide and will continue to provide information to gain a much deeper understanding of GPCR signaling and regulation.

Knowledge on the PTMs that affect specific receptor sites has already produced advances in our understanding of organ function. In a very elegant paper, Bradley and coworkers [126] reported a genetically engineered mouse expressing a G protein-biased M3-muscarinic acetylcholine mutant receptor, which allowed defining the role of receptor phosphorylation in bronchial smooth muscle contraction in health and in a model of asthma. G protein-dependent signaling and receptor phosphorylation-dependent signaling were mapped, which potentially predicts the outcome of biased agents [126]. Such findings and developments provide better approaches for drug design.

Ghrelin is a pleiotropic hormone secreted by the stomach that promotes food-seeking behaviors and a positive energy balance [127]. Studies on ghrelin receptors have also provided exciting insight on the functional relevance of GPCRs' phosphorylation sites. Using MS the phosphorylation sites on the ghrelin receptor, GHSR1a, were defined as S³⁶², S³⁶³ and T³⁶⁶; these residues are located at the carboxyl terminus and seem to be primarily responsible for β -arrestin binding [58]. Ghrelin receptor knockout animals did not show any clear change in body weight or energy consumption [128]. Interestingly, rats with a mutation deleting the distal part of the receptor's carboxyl-terminal tail showed increased body weight and adiposity and reduced glucose tolerance [129]. Such mutation, that maintains GHSR cell surface abundance but alters its signaling properties, provided important insight into the role of

the ghrelin receptor stressing the physiological role of the carboxyl terminus as a suppressor of ghrelin sensitivity [129].

Clearly, the previous two examples provide compelling evidence on the importance of carefully studying GPCR structure and function to better understand physiology and pathology, needed for developing tools for pharmacology and therapeutics.

Acknowledgments: Research in our laboratory is partially supported by Grants from CONACYT [253156 and Fronteras 882] and DGAPA-UNAM [200915]. The generous help and advice of Ross Tomaino, MS, Associate Director of the Taplin Mass Spectrometry Facility, Harvard Medical School is gratefully acknowledged.

Author Contributions: The initial draft of this review was jointly written by Marco A. Alfonzo-Méndez and Rocío Alcántara-Hernández, and it was reviewed and further organized by J. Adolfo García-Sáinz. Marco Antonio Alfonzo-Méndez is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM and a recipient of a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

GPCRs	G protein coupled-receptors
PTMs	Posttranslational modifications
MS	Mass spectrometry
GRKs	G protein-coupled receptor kinases
FRET	Förster resonance energy transfer
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer

References

1. Fredriksson, R.; Lagerstrom, M.C.; Lundin, L.G.; Schiöth, H.B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256–1272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fredriksson, R.; Schiöth, H.B. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1414–1425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Blumenthal, D.K.; Garrison, J.C. Pharmacodynamics: Molecular mechanisms of drug action. In *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th ed.; Brunton, L., Ed.; McGraw Hill: New York, NY, USA, 2011; pp. 47–72.
4. Lefkowitz, R.J. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 6366–6378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jacobson, K.A. New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *98*, 541–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mustafi, D.; Palczewski, K. Topology of class A G protein-coupled receptors: Insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kobilka, B. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 6380–6388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Thomsen, A.R.; Plouffe, B.; Cahill, T.J., 3rd; Shukla, A.K.; Tarrasch, J.T.; Dosey, A.M.; Kahsai, A.W.; Strachan, R.T.; Pani, B.; Mahoney, J.P.; et al. GPCR-G protein- β -arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling. *Cell* **2016**, *166*, 907–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. García-Sáinz, J.A.; Vázquez-Prado, J.; Medina, L.C. α_1 -Adrenoceptors: Function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *389*, 1–12. [[CrossRef](#)]
10. Vázquez-Prado, J.; Casas-González, P.; García-Sáinz, J.A. G protein-coupled receptor cross-talk: Pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal.* **2003**, *15*, 549–557. [[CrossRef](#)]
11. García-Sáinz, J.A.; Romero-Ávila, M.T.; Molina-Muñoz, T.; García-Pasquel, M.-J. G-protein-coupled receptor-receptor tyrosine kinase crosstalk. Regulation of receptor sensitivity and roles of autocrine feedback loops and signal integration. *Curr. Signal Transduct. Ther.* **2008**, *3*, 174–182. [[CrossRef](#)]
12. Xin, F.; Radivojac, P. Post-translational modifications induce significant yet not extreme changes to protein structure. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2905–2913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Dores, M.R.; Lin, H.; N, J.G.; Mendez, F.; Trejo, J. The α -arrestin ARRDC3 mediates ALIX ubiquitination and G protein-coupled receptor lysosomal sorting. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 4660–4673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dores, M.R.; Trejo, J. Ubiquitination of G protein-coupled receptors: Functional implications and drug discovery. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 563–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Venkatakrishnan, A.J.; Deupi, X.; Lebon, G.; Tate, C.G.; Schertler, G.F.; Babu, M.M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2013**, *494*, 185–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Li, J.; Philip, J.L.; Xu, X.; Theccanat, T.; Abdur Razzaque, M.; Akhter, S.A. β -Arrestins regulate human cardiac fibroblast transformation and collagen synthesis in adverse ventricular remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, *76*, 73–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Le Trong, I.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rosa, M.; Bech-Serra, J.J.; Canals, F.; Zajac, J.M.; Talmont, F.; Arsequell, G.; Valencia, G. Optimized proteomic mass spectrometry characterization of recombinant human mu-opioid receptor functionally expressed in *pichia pastoris* cell lines. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 3162–3173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bortolato, A.; Dore, A.S.; Hollenstein, K.; Tehan, B.G.; Mason, J.S.; Marshall, F.H. Structure of class B GPCRs: New horizons for drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 3132–3145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hollenstein, K.; de Graaf, C.; Bortolato, A.; Wang, M.W.; Marshall, F.H.; Stevens, R.C. Insights into the structure of class B GPCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 12–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Dore, A.S.; Okrasa, K.; Patel, J.C.; Serrano-Vega, M.; Bennett, K.; Cooke, R.M.; Errey, J.C.; Jazayeri, A.; Khan, S.; Tehan, B.; et al. Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature* **2014**, *511*, 557–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. McCusker, E.C.; Bane, S.E.; O'Malley, M.A.; Robinson, A.S. Heterologous GPCR expression: A bottleneck to obtaining crystal structures. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 540–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hassell, A.M.; An, G.; Bledsoe, R.K.; Bynum, J.M.; Carter, H.L., 3rd; Deng, S.J.; Gampe, R.T.; Grisard, T.E.; Madauss, K.P.; Nolte, R.T.; et al. Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 72–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rasmussen, S.G.; DeVree, B.T.; Zou, Y.; Kruse, A.C.; Chung, K.Y.; Kobilka, T.S.; Thian, F.S.; Chae, P.S.; Pardon, E.; Calinski, D.; et al. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **2011**, *477*, 549–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shukla, A.K.; Manglik, A.; Kruse, A.C.; Xiao, K.; Reis, R.I.; Tseng, W.C.; Staus, D.P.; Hilger, D.; Uysal, S.; Huang, L.Y.; et al. Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* **2013**, *497*, 137–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Na, S.; Jeong, J.; Park, H.; Lee, K.J.; Paek, E. Unrestrictive identification of multiple post-translational modifications from tandem mass spectrometry using an error-tolerant algorithm based on an extended sequence tag approach. *Mol. Cell. Proteom.* **2008**, *7*, 2452–2463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kaltashov, I.A.; Eyles, S.J. Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *21*, 37–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lee, J.J.; Park, Y.S.; Lee, K.J. Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry for determining protein structural changes in drug discovery. *Arch. Pharm. Res.* **2015**, *38*, 1737–1745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Huang, R.Y.; Chen, G. Higher order structure characterization of protein therapeutics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 6541–6558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Wei, H.; Mo, J.; Tao, L.; Russell, R.J.; Tymiak, A.A.; Chen, G.; Jacob, R.E.; Engen, J.R. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: Methodology and applications. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 95–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Butcher, A.J.; Prihandoko, R.; Kong, K.C.; McWilliams, P.; Edwards, J.M.; Bottrill, A.; Mistry, S.; Tobin, A.B. Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 11506–11518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tobin, A.B.; Butcher, A.J.; Kong, K.C. Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 413–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Norskov-Lauritsen, L.; Brauner-Osborne, H. Role of post-translational modifications on structure, function and pharmacology of class C G protein-coupled receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *763*, 233–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hornbeck, P.V.; Zhang, B.; Murray, B.; Kornhauser, J.M.; Latham, V.; Skrzypek, E. PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D512–D520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pagel, O.; Loroch, S.; Sickmann, A.; Zahedi, R.P. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev. Proteom.* **2015**, *12*, 235–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Maeda, T.; Imanishi, Y.; Palczewski, K. Rhodopsin phosphorylation: 30 years later. *Prog. Retin. Eye Res.* **2003**, *22*, 417–434. [[CrossRef](#)]
37. Tobin, A.B. G-protein-coupled receptor phosphorylation: Where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, S167–S176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ferguson, S.S. Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 173–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Baltensperger, K.; Karoor, V.; Paul, H.; Ruoho, A.; Czech, M.P.; Malbon, C.C. The β -adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 1061–1064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Gavi, S.; Shumay, E.; Wang, H.Y.; Malbon, C.C. G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: Crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **2006**, *17*, 48–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Casas-González, P.; García-Sáinz, J.A. Role of epidermal growth factor receptor transactivation in α_{1B} -adrenoceptor phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *542*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Butcher, A.J.; Hudson, B.D.; Shimpukade, B.; Alvarez-Curto, E.; Prihandoko, R.; Ulven, T.; Milligan, G.; Tobin, A.B. Concomitant action of structural elements and receptor phosphorylation determine arrestin-3 interaction with the free fatty acid receptor FFA4. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 18451–18465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Shenoy, S.K.; Lefkowitz, R.J. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 521–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mouldous, L.; Froment, C.; Burlet-Schiltz, O.; Schulz, S.; Mollereau, C. Phosphoproteomic analysis of the mouse brain mu-opioid (MOP) receptor. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 2401–2408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Alfonso-Garrido, J.; Garcia-Calvo, E.; Luque-Garcia, J.L. Sample preparation strategies for improving the identification of membrane proteins by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 4893–4905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ohguro, H.; van Hooser, J.P.; Milam, A.H.; Palczewski, K. Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14259–14262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lee, K.A.; Craven, K.B.; Niemi, G.A.; Hurley, J.B. Mass spectrometric analysis of the kinetics of in vivo rhodopsin phosphorylation. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 862–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Doronin, S.; Lin, F.; Wang, H.Y.; Malbon, C.C. The full-length, cytoplasmic C-terminus of the β 2-adrenergic receptor expressed in E. coli acts as a substrate for phosphorylation by protein kinase A, insulin receptor tyrosine kinase, GRK2, but not protein kinase C and suppresses desensitization when expressed in vivo. *Protein Expr. Purif.* **2000**, *20*, 451–461. [[PubMed](#)]
49. Nobles, K.N.; Xiao, K.; Ahn, S.; Shukla, A.K.; Lam, C.M.; Rajagopal, S.; Strachan, R.T.; Huang, T.Y.; Bressler, E.A.; Hara, M.R.; et al. Distinct phosphorylation sites on the β_2 -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci. Signal.* **2011**, *4*, ra51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Gao, S.; Malbon, C.; Wang, H.Y. Probing the stoichiometry of β_2 -adrenergic receptor phosphorylation by targeted mass spectrometry. *J. Mol. Signal.* **2014**, *9*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wu, S.; Birnbaumer, M.; Guan, Z. Phosphorylation analysis of G protein-coupled receptor by mass spectrometry: Identification of a phosphorylation site in V2 vasopressin receptor. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6034–6037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Busillo, J.M.; Armando, S.; Sengupta, R.; Meucci, O.; Bouvier, M.; Benovic, J.L. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7805–7817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jeong, J.; Park, Y.U.; Kim, D.K.; Lee, S.; Kwak, Y.; Lee, S.A.; Lee, H.; Suh, Y.H.; Gho, Y.S.; Hwang, D.; et al. Cdk5 phosphorylates dopamine D2 receptor and attenuates downstream signaling. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Chen, X.; Bai, B.; Tian, Y.; Du, H.; Chen, J. Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 31173–31187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bray, L.; Froment, C.; Pardo, P.; Candotto, C.; Burlet-Schiltz, O.; Zajac, J.M.; Mollereau, C.; Mouldous, L. Identification and functional characterization of the phosphorylation sites of the neuropeptide FF2 receptor. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 33754–33766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Chen, C.; Chiu, Y.T.; Wu, W.; Huang, P.; Mann, A.; Schulz, S.; Liu-Chen, L.Y. Determination of sites of U50,488H-promoted phosphorylation of the mouse kappa opioid receptor (KOPR): Disconnect between KOPR phosphorylation and internalization. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 497–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zindel, D.; Engel, S.; Bottrill, A.R.; Pin, J.P.; Prezeau, L.; Tobin, A.B.; Bunemann, M.; Krasel, C.; Butcher, A.J. Identification of key phosphorylation sites in PTH1R which determine arrestin3 binding and fine tune receptor signaling. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 4173–4192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bouzo-Lorenzo, M.; Santo-Zas, I.; Lodeiro, M.; Nogueiras, R.; Casanueva, F.F.; Castro, M.; Pazos, Y.; Tobin, A.B.; Butcher, A.J.; Camina, J.P. Distinct phosphorylation sites on the ghrelin receptor, GHSR1a, establish a code that determines the functions of ss-arrestins. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Kennedy, J.E.; Marchese, A. Regulation of GPCR Trafficking by Ubiquitin. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2015**, *132*, 15–38. [[PubMed](#)]
60. Skieterska, K.; Rondou, P.; van Craenenbroeck, K. Dopamine D4 receptor ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 601–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Cottrell, G.S. Roles of proteolysis in regulation of GPCR function. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 576–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Shenoy, S.K.; McDonald, P.H.; Kohout, T.A.; Lefkowitz, R.J. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β_2 -adrenergic receptor and β -arrestin. *Science* **2001**, *294*, 1307–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Xiao, K.; Shenoy, S.K. β_2 -adrenergic receptor lysosomal trafficking is regulated by ubiquitination of lysyl residues in two distinct receptor domains. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 12785–12795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Sarker, S.; Xiao, K.; Shenoy, S.K. A tale of two sites: How ubiquitination of a G protein-coupled receptor is coupled to its lysosomal trafficking from distinct receptor domains. *Commun. Integr. Biol.* **2011**, *4*, 528–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Jean-Charles, P.Y.; Snyder, J.C.; Shenoy, S.K. Chapter One—Ubiquitination and deubiquitination of G protein-coupled receptors. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2016**, *141*, 1–55. [[PubMed](#)]
66. Han, S.O.; Xiao, K.; Kim, J.; Wu, J.H.; Wisler, J.W.; Nakamura, N.; Freedman, N.J.; Shenoy, S.K. MARCH2 promotes endocytosis and lysosomal sorting of carvedilol-bound β_2 -adrenergic receptors. *J. Cell Biol.* **2012**, *199*, 817–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Kenakin, T. Quantifying biased β -arrestin signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2014**, *219*, 57–83. [[PubMed](#)]
68. Kenakin, T. The effective application of biased signaling to new drug discovery. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *88*, 1055–1061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Kenakin, T.P. *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2009; p. 389.
70. Oo, M.L.; Thangada, S.; Wu, M.T.; Liu, C.H.; Macdonald, T.L.; Lynch, K.R.; Lin, C.Y.; Hla, T. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9082–9089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Rivera, J.; Proia, R.L.; Olivera, A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 753–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Choi, J.W.; Gardell, S.E.; Herr, D.R.; Rivera, R.; Lee, C.W.; Noguchi, K.; Teo, S.T.; Yung, Y.C.; Lu, M.; Kennedy, G.; et al. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P₁) modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 751–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Brinkmann, V.; Billich, A.; Baumruker, T.; Heining, P.; Schmouder, R.; Francis, G.; Aradhye, S.; Burtin, P. Fingolimod (FTY720): Discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 883–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Chung, K.Y.; Day, P.W.; Velez-Ruiz, G.; Sunahara, R.K.; Kobilka, B.K. Identification of GPCR-interacting cytosolic proteins using HDL particles and mass spectrometry-based proteomic approach. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Daulat, A.M.; Maurice, P.; Froment, C.; Guillaume, J.L.; Broussard, C.; Monsarrat, B.; Delagrangé, P.; Jockers, R. Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol. Cell. Proteom.* **2007**, *6*, 835–844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. AbdAlla, S.; Lother, H.; el Massiery, A.; Quitterer, U. Increased AT₁ receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1003–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Chawla, A.; Repa, J.J.; Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J. Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files. *Science* **2001**, *294*, 1866–1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Stoddart, L.A.; Smith, N.J.; Milligan, G. International Union of Pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: Pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60*, 405–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Hirasawa, A.; Tsumaya, K.; Awaji, T.; Katsuma, S.; Adachi, T.; Yamada, M.; Sugimoto, Y.; Miyazaki, S.; Tsujimoto, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 90–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Ichimura, A.; Hirasawa, A.; Poulain-Godefroy, O.; Bonnefond, A.; Hara, T.; Yengo, L.; Kimura, I.; Leloire, A.; Liu, N.; Iida, K.; et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* **2012**, *483*, 350–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. 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. GPR120 is an ω -3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **2010**, *142*, 687–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Hara, T.; Kashiwara, D.; Ichimura, A.; Kimura, I.; Tsujimoto, G.; Hirasawa, A. Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 1292–1300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Sánchez-Reyes, O.B.; Romero-Ávila, M.T.; Castillo-Badillo, J.A.; Takei, Y.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G.; Villalobos-Molina, R.; García-Sáinz, J.A. Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *723*, 368–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Burns, R.N.; Moniri, N.H. Agonism with the ω -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. Commun.* **2010**, *396*, 1030–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Burns, R.N.; Singh, M.; Senatorov, I.S.; Moniri, N.H. Mechanisms of homologous and heterologous phosphorylation of FFA receptor 4 (GPR120): GRK6 and PKC mediate phosphorylation of Thr³⁴⁷, Ser³⁵⁰, and Ser³⁵⁷ in the C-terminal tail. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *87*, 650–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Prihandoko, R.; Alvarez-Curto, E.; Hudson, B.D.; Butcher, A.J.; Ulven, T.; Miller, A.M.; Tobin, A.B.; Milligan, G. Distinct phosphorylation clusters determine the signaling outcome of free fatty acid receptor 4/G protein-coupled receptor 120. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *89*, 505–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Xue, Y.; Ren, J.; Gao, X.; Jin, C.; Wen, L.; Yao, X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol. Cell. Proteom.* **2008**, *7*, 1598–1608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Blom, N.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 1351–1362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Liu, H.D.; Wang, W.B.; Xu, Z.G.; Liu, C.H.; He, D.F.; Du, L.P.; Li, M.Y.; Yu, X.; Sun, J.P. FFA4 receptor (GPR120): A hot target for the development of anti-diabetic therapies. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *763*, 160–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Hieble, J.P.; Bylund, D.B.; Clarke, D.E.; Eikenburg, D.C.; Langer, S.Z.; Lefkowitz, R.J.; Minneman, K.P.; Ruffolo, R.R., Jr. International union of pharmacology. X. recommendation for nomenclature of α 1-adrenoceptors: Consensus update. *Pharmacol. Rev.* **1995**, *47*, 267–270. [[PubMed](#)]
91. García-Sáinz, J.A.; Vázquez-Prado, J.; Villalobos-Molina, R. α ₁-Adrenoceptors: Subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch. Med. Res.* **1999**, *30*, 449–458. [[CrossRef](#)]
92. Cabrera-Wrooman, A.; Romero-Ávila, M.T.; García-Sáinz, J.A. Roles of the α _{1A}-adrenergic receptor carboxyl tail in protein kinase C-induced phosphorylation and desensitization. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2010**, *382*, 499–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. García-Sáinz, J.A.; Rodríguez-Pérez, C.E.; Romero-Ávila, M.T. Human α _{1D} adrenoceptor phosphorylation and desensitization. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1853–1858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. García-Sáinz, J.A.; Romero-Ávila, M.T.; Alcántara-Hernández, R. Mechanisms involved in α _{1B}-adrenoceptor desensitization. *IUBMB Life* **2011**, *63*, 811–815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. García-Sáinz, J.A.; Vázquez-Cuevas, F.G.; Romero-Ávila, M.T. Phosphorylation and desensitization of α_{1D} -adrenergic receptors. *Biochem. J.* **2001**, *353*, 603–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rodríguez-Pérez, C.E.; Romero-Ávila, M.T.; Reyes-Cruz, G.; García-Sáinz, J.A. Signaling properties of human α_{1D} -adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: Intrinsic activity, agonist-mediated activation, and desensitization. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2009**, *380*, 99–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Vázquez-Prado, J.; García-Sáinz, J.A. Effect of phorbol myristate acetate on α_1 -adrenergic action in cells expressing recombinant α_1 -adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 17–22. [[PubMed](#)]
98. Vázquez-Prado, J.; Medina, L.C.; García-Sáinz, J.A. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of α_{1B} -adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 27330–27337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Diviani, D.; Lattion, A.L.; Cotecchia, S. Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28712–28719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Diviani, D.; Lattion, A.L.; Larbi, N.; Kunapuli, P.; Pronin, A.; Benovic, J.L.; Cotecchia, S. Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5049–5058. [[PubMed](#)]
101. Lattion, A.L.; Diviani, D.; Cotecchia, S. Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22887–22893. [[PubMed](#)]
102. Stanasila, L.; Abuin, L.; Dey, J.; Cotecchia, S. Different internalization properties of the α_{1A} - and α_{1B} -adrenergic receptor subtypes: The potential role of receptor interaction with β -arrestins and AP50. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 562–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Morris, D.P.; Price, R.R.; Smith, M.P.; Lei, B.; Schwinn, D.A. Cellular trafficking of human α_{1A} -adrenergic receptors is continuous and primarily agonist-independent. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 843–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Price, R.R.; Morris, D.P.; Biswas, G.; Smith, M.P.; Schwinn, D.A. Acute agonist-mediated desensitization of the human α_{1A} -adrenergic receptor is primarily independent of carboxyl terminus regulation: Implications for regulation of α_{1A} AR splice variants. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9570–9579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Schwinn, D.A.; Kwatra, M.M. Expression and regulation of α_1 -adrenergic receptors in human tissues. In *Catecholamines. Bridging Basic Science with Clinical Medicine*; Goldstein, D.S., Eisenhofer, G., McCarty, R., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1998; pp. 390–394.
106. Akinaga, J.; Lima, V.; Kiguti, L.R.; Hebel-Barbosa, F.; Alcántara-Hernández, R.; García-Sáinz, J.A.; Pupo, A.S. Differential phosphorylation, desensitization, and internalization of α_{1A} -adrenoceptors activated by norepinephrine and oxymetazoline. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *83*, 870–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Shi, T.; Papay, R.S.; Perez, D.M. α_{1a} -Adrenergic receptor prevents cardiac ischemic damage through PKC δ a/GLUT1/4-mediated glucose uptake. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2016**, *36*, 261–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Wu, S.C.; O'Connell, T.D. Nuclear compartmentalization of α_1 -adrenergic receptor signaling in adult cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2015**, *65*, 91–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Schulman, C.C.; Cortvriend, J.; Jonas, U.; Lock, T.M.; Vaage, S.; Speakman, M.J. Tamsulosin, the first prostate-selective α_{1A} -adrenoceptor antagonist. Analysis of a multinational, multicentre, open-label study assessing the long-term efficacy and safety in patients with benign prostatic obstruction (symptomatic BPH). European Tamsulosin Study Group. *Eur. Urol.* **1996**, *29*, 145–154. [[PubMed](#)]
110. Villalobos-Molina, R.; Ibarra, M. α_1 -Adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the α_{1D} or α_{1A} subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *298*, 257–263. [[CrossRef](#)]
111. Villalobos-Molina, R.; Ibarra, M. Vascular α_{1D} -adrenoceptors: Are they related to hypertension? *Arch. Med. Res.* **1999**, *30*, 347–352. [[CrossRef](#)]
112. Villalobos-Molina, R.; López-Guerrero, J.J.; Ibarra, M. Functional evidence of α_{1D} -adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 1534–1536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

113. Tanoue, A.; Nasa, Y.; Koshimizu, T.; Shinoura, H.; Oshikawa, S.; Kawai, T.; Sunada, S.; Takeo, S.; Tsujimoto, G. The α_{1D} -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 765–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. García-Sáinz, J.A.; Romero-Ávila, M.T.; Medina, L.C. α_{1D} -Adrenergic receptors constitutive activity and reduced expression at the plasma membrane. *Methods Enzymol.* **2010**, *484*, 109–125. [[PubMed](#)]
115. García-Sáinz, J.A.; Torres-Padilla, M.E. Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1D} -adrenoceptors. *FEBS Lett.* **1999**, *443*, 277–281. [[CrossRef](#)]
116. Gisbert, R.; Noguera, M.A.; Ivorra, M.D.; D’Ocon, P. Functional evidence of a constitutively active population of α_{1D} -adrenoceptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295*, 810–817. [[PubMed](#)]
117. Noguera, M.A.; Ivorra, M.D.; D’Ocon, P. Functional evidence of inverse agonism in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *119*, 158–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Ziani, K.; Gisbert, R.; Noguera, M.A.; Ivorra, M.D.; D’Ocon, P. Modulatory role of a constitutively active population of α_{1D} -adrenoceptors in conductance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *282*, H475–H481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. McCune, D.F.; Edelmann, S.E.; Olges, J.R.; Post, G.R.; Waldrop, B.A.; Waugh, D.J.; Perez, D.M.; Piascik, M.T. Regulation of the cellular localization and signaling properties of the α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 659–666. [[PubMed](#)]
120. Hague, C.; Chen, Z.; Pupo, A.S.; Schulte, N.A.; Toews, M.L.; Minneman, K.P. The N Terminus of the Human α_{1D} -Adrenergic Receptor Prevents Cell Surface Expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *309*, 388–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Hague, C.; Lee, S.E.; Chen, Z.; Prinster, S.C.; Hall, R.A.; Minneman, K.P. Heterodimers of α_{1B} - and α_{1D} -adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 45–55. [[PubMed](#)]
122. Hague, C.; Uberti, M.A.; Chen, Z.; Hall, R.A.; Minneman, K.P. Cell surface expression of α_{1d} -adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with α_{1b} -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15541–15549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Kountz, T.S.; Lee, K.S.; Aggarwal-Howarth, S.; Curran, E.; Park, J.M.; Harris, D.A.; Stewart, A.; Hendrickson, J.; Camp, N.D.; Wolf-Yadlin, A.; et al. Endogenous N-terminal domain cleavage modulates α_{1d} -adrenergic receptor pharmacodynamics. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 18210–18221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Chen, Z.; Hague, C.; Hall, R.A.; Minneman, K.P. Syntrophins regulate α_{1D} -adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 12414–12420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Lyssand, J.S.; Defino, M.C.; Tang, X.B.; Hertz, A.L.; Feller, D.B.; Wacker, J.L.; Adams, M.E.; Hague, C. Blood pressure is regulated by an α_{1D} -adrenergic receptor/dystrophin signalosome. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 18792–18800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Bradley, S.J.; Wiegman, C.H.; Iglesias, M.M.; Kong, K.C.; Butcher, A.J.; Plouffe, B.; Goupil, E.; Bourgognon, J.M.; Macedo-Hatch, T.; LeGouill, C.; et al. Mapping physiological G protein-coupled receptor signaling pathways reveals a role for receptor phosphorylation in airway contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 4524–4529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **1999**, *402*, 656–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Zigman, J.M.; Nakano, Y.; Coppari, R.; Balthasar, N.; Marcus, J.N.; Lee, C.E.; Jones, J.E.; Deysher, A.E.; Waxman, A.R.; White, R.D.; et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 3564–3572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Chebani, Y.; Marion, C.; Zizzari, P.; Chettab, K.; Pastor, M.; Korostelev, M.; Geny, D.; Epelbaum, J.; Tolle, V.; Morisset-Lopez, S.; et al. Enhanced responsiveness of Ghrelin Q343X rats to ghrelin results in enhanced adiposity without increased appetite. *Sci. Signal.* **2016**, *9*, ra39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

